

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

PRISCILA DE SOUZA

**Interação do estresse oxidativo com a via Rho-A/Rho-quinase
(ROCK) e metaloproteinases de matriz (MMP) na disfunção
vascular da sepse e pós-sepse**

CURITIBA

2014

PRISCILA DE SOUZA

**Interação do estresse oxidativo com a via Rho-A/Rho-quinase
(ROCK) e metaloproteinases de matriz (MMP) na disfunção
vascular da sepse e pós-sepse**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná (UFPR), como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

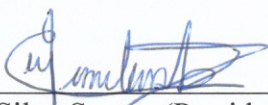
Orientador: Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos

CURITIBA

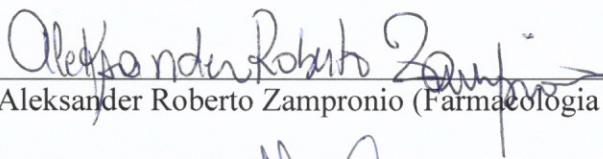
2014

PARECER

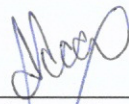
A Comissão Examinadora da Tese de Doutorado intitulada “INTERAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO COM A VIA RHO-A/RHO-QUINASE (ROCK) E METALOPROTEINASES DE MATRIZ (MMP) NA DISFUNÇÃO VASCULAR DA SEPSE E PÓS-SEPSE”, de autoria da pós-graduanda **PRISCILA DE SOUZA**, sob orientação do Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos e banca composta por: Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos (Presidente – Farmacologia – UFSC), Prof. Dr. Aleksander Roberto Zamprônio (Farmacologia – UFPR), Prof.^a Dr.^a Alexandra Acco (Farmacologia – UFPR), Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol (Medicina – UNESC) e Prof.^a Dr.^a Rita de Cassia Aleixo Tostes Passaglia (Farmacologia – FMRP/USP), reuniu-se e de acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a pós-graduanda foi APROVADA. Para a devida publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas pelo seu orientador. Em Curitiba, 29 de agosto de 2014.



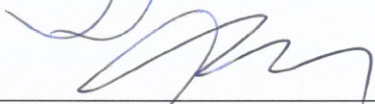
Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos (Presidente – Farmacologia – UFSC)



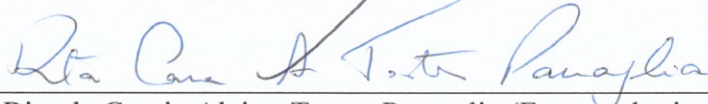
Prof. Dr. Aleksander Roberto Zamprônio (Farmacologia – UFPR)



Prof.^a Dr.^a Alexandra Acco (Farmacologia – UFPR)



Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol (Medicina – UNESC)

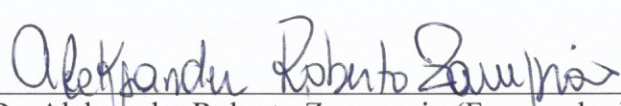


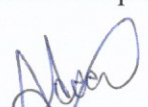
Prof.^a Dr.^a Rita de Cassia Aleixo Tostes Passaglia (Farmacologia – FMRP/USP)

ATA DO JULGAMENTO DA 29ª DEFESA DE TESE DE DOUTORADO

Ao vigésimo nono dia do mês de agosto do ano de dois mil e quatorze, às oito horas e trinta minutos, no Auditório do Departamento de Farmacologia, do Anexo I, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, reuniu-se a Comissão Examinadora da Tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, de autoria da pós-graduanda **PRISCILA DE SOUZA**, intitulada "INTERAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO COM A VIA RHO-A/RHO-QUINASE (ROCK) E METALOPROTEINASES DE MATRIZ (MMP) NA DISFUNÇÃO VASCULAR DA SEPSE E PÓS-SEPSE.", sob orientação do Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos e banca composta por: Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos (Presidente – Farmacologia – UFSC), Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio (Farmacologia – UFPR), Prof.^a Dr.^a Alexandra Acco (Farmacologia – UFPR), Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol (Medicina – UNESC) e Prof.^a Dr.^a Rita de Cassia Aleixo Tostes Passaglia (Farmacologia – FMRP/USP). A Banca Examinadora iniciou os trabalhos e a candidata teve quarenta e cinco minutos para expor oralmente seu trabalho, sendo em seguida arguida durante quinze minutos por cada um dos membros da Banca, e tendo trinta minutos para responder a cada uma das arguições. No final a Comissão Examinadora emitiu o seguinte parecer: Aprovado. Para a publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas que serão conferidas por seu orientador. Nada mais havendo a tratar, o Presidente deu por encerrada a sessão, da qual foi lavrada a presente ata, que será assinada pelo Presidente e pelos demais membros da Comissão Examinadora, em Curitiba, 29 de agosto de 2014.


Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos (Presidente – Farmacologia – UFSC)


Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio (Farmacologia – UFPR)


Prof.^a Dr.^a Alexandra Acco (Farmacologia – UFPR)


Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol (Medicina – UNESC)


Prof.^a Dr.^a Rita de Cassia Aleixo Tostes Passaglia (Farmacologia – FMRP/USP)

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades.

Ao meu pai José Antonio, minha mãe Elizabeth, e minha irmã Thatiany, por serem meu porto seguro. Agradeço por sempre acreditarem em mim e nos meus sonhos. Amo vocês.

Ao professor Dr. José Eduardo, pela orientação, confiança e incentivo. Obrigada pelas constantes demonstrações de sabedoria e humildade, e por todo esforço na realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Richard Schulz, pela oportunidade de realizar o estágio sanduíche em seu laboratório. Obrigada pela prontidão e ensinamentos.

À professora Dra. Maria Consuelo, por toda consideração e incentivo.

Ao Prof. Dr. Jamil Assreuy, à Prof. Dra. Maria Fernanda Werner e ao Prof. Dr. Arquimedes Gasparotto Jr, por propiciarem colaborações importantes deste estudo.

Aos professores, Dr. Aleksander Zampronio, Dra. Alexandra Acco, Dr. Felipe Dalpizzol, Dra. Rita de Cássia Tostes, por comporem a banca examinadora, e pelas excelentes sugestões e correções.

Agradeço minhas companheiras de laboratório Rita Vilhena e Sandra Crestani, pela amizade, carinho e parceria ao longo desses anos. Gestos de carinho e atenção fazem-nos perceber quanto algumas pessoas são especiais na forma de ser e como são bem-vindas as suas ações.

Um agradecimento especial à Haissa Brito e Karla Guarido por todos esses anos de cumplicidade, acolhida e principalmente na amizade que fizeram parte da minha formação e que vão continuar presentes em minha vida.

Aos mais que colegas de laboratório e agregados: Luisa Mota, Daniele Ferreira, Angélica Bernardelli, Daiana Vogel, Ronald Gonçalves, Bruna Sant'Helena, Yanna Rattmann, Lucas Gazarini e Adriane Madeira, obrigada pela amizade e por todo o incentivo ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

A todos os alunos, professores e funcionários do departamento e do biotério das Universidade Federal do Paraná, Universidade Federal de Santa Catarina e Universidade de Alberta, que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização desta pesquisa.

À CAPES pela bolsa de doutorado concedida.

Aos animais meu respeito e gratidão.

A todos que, de algum modo, contribuíram para a execução deste trabalho, o meu muito obrigado.

Entrega o teu caminho ao Senhor;
confia nele, e ele tudo fará.

Salmos 37:5

As pessoas são aquilo que elas amam.

Rubem Alves

SUMÁRIO

	Lista de abreviaturas, siglas e símbolos.....	i
	Lista de figuras.....	v
	Lista de tabelas.....	viii
	Resumo.....	ix
	Abstract.....	xi
1.	INTRODUÇÃO.....	1
1.1.	Sepse, sepse severa e choque séptico: epidemiologia e características.....	1
1.2.	Participação da SIRS na evolução da sepse à sepse severa e ao choque séptico.....	5
1.3.	A função cardiovascular na sepse, sepse severa e choque séptico	9
1.4.	Evidências clínicas e experimentais de disfunções orgânicas em sobreviventes de sepse severa e choque séptico.....	12
2.	OBJETIVOS.....	18
2.1.	Geral.....	18
2.2.	Específicos.....	18
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1.	Animais.....	20
3.2.	Drogas e sais.....	20
3.3.	Protocolo Experimental.....	21
3.3.1.	Indução da sepse.....	21
3.3.2.	Determinação dos níveis plasmáticos de nitrato/nitrito (NO _x).....	23
3.3.3.	Determinação da reatividade vascular em modelo de aorta isolada	23
3.3.4.	Hemograma.....	25
3.3.5.	Registro direto da pressão arterial em ratos anestesiados.....	25
3.3.6.	Avaliação da diurese.....	26
3.3.7.	Dosagens bioquímicas.....	26
3.3.8.	Avaliação do peso relativo da aorta, rim e coração.....	27
3.3.9.	Avaliação do ganho ponderal, consumo alimentar e hídrico.....	27
3.3.10.	Fluxo sanguíneo renal.....	27
3.3.11.	Rim isolado.....	28

3.3.12.	Determinação do conteúdo de hidroperóxidos lipídicos (LOOH).....	30
3.3.13.	Determinação dos níveis de glutathione (GSH).....	30
3.3.14.	Determinação da atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD).....	30
3.3.15.	Determinação da atividade enzimática da catalase (CAT).....	31
3.3.16.	Determinação da atividade enzimática da glutathione-S-transferase (GST).....	31
3.3.17.	Imunoelektroforese.....	32
3.3.18.	Medida da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) por sonda fluorescente.....	33
3.3.19.	Marcação dos níveis de peroxinitrito por imunofluorescência.....	34
3.3.20.	Atividade das enzimas metaloproteinases por zimografia.....	34
3.3.21.	Análises histológicas.....	35
3.3.22.	Análise estatística.....	35
4.	RESULTADOS	36
4.1.	PARTE I.....	36
4.1.1.	Caracterização das alterações cardiovasculares agudas no modelo de sepse e determinação dos grupos experimentais.....	36
4.2.	PARTE II.....	42
4.2.1.	Avaliação geral da função cardiovascular em ratos sobreviventes à sepse.....	42
4.3.	PARTE III.....	49
4.3.1.	Evolução no pós-sepse.....	49
4.3.2.	Avaliações hematológicas e bioquímicas.....	49
4.3.3.	Fluxo renal e rim isolado.....	50
4.3.4.	Respostas sistêmicas a vasopressores.....	54
4.4.	PARTE IV.....	58
4.4.1.	Investigação da responsividade vascular <i>in vitro</i>	58
4.4.2.	O papel do endotélio na hiper-contratilidade vascular no pós-sepse	64
4.5.	PARTE V.....	75
4.5.1.	Envolvimento da via Rho-A/ROCK na hiper-contratilidade vascular no pós-sepse.....	75
4.6.	PARTE VI.....	79

4.6.1.	Envolvimento das metaloproteinases de matriz (MMPs) na hiper-contratilidade vascular no pós-sepse.....	79
5.	DISCUSSÃO	87
6.	CONCLUSÃO	102
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACh	Acetilcolina
ADH	Hormônio anti-diurético
All	Angiotensina II
Ang II	Angiotensina II
ANOVA	Análise de variância
APS	Persulfato de amônia
AT ₁ R	Receptor para angiotensina II tipo AT1
AT ₂ R	Receptor para angiotensina II tipo AT2
ATP	Trifosfato de adenosina
AVP	Vasopressina
BCA	Ácido bicinchonínico 4,4'-dicarboxi-2,2'- biquinolina
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BHT	Butilhidroxitolueno
BK	Bradicinina
BSA	Albumina sérica bovina
Ca ²⁺	Cálcio
CAMKII	Quinase dependente da Ca ²⁺ /calmodulina tipo II
CAT	Catalase
CCR	Curva concentração resposta
cGMP	Monofosfato cíclico de guanosina
Cl ⁻	Cloreto
CLP	Ligadura e perfuração do ceco
CT	Grupo controle
DCV	Doença cardiovascular
DTM-AVP	1-fenilacetil,O-Me-D-Tir 2, Arg6,8, Lis9-vasopressina
DTNB	Ácido ditionitrobenzóico
DTT	Ditiotreitol
Dx	Doxiciclina
E ⁺	Presença de endotélio
E ⁻	Ausência de endotélio
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético

Emax	Efeito máximo
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
et al	e outros
FC	Frequência cardíaca
Fen	Fenilefrina
FeSO ₄ .NH ₄	Sulfato de amônio
FSR	Fluxo sanguíneo renal
FT	Fator tecidual
GCs	Guanilato ciclase solúvel
GSH	Glutathione
GST	Glutathione-S-transferase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HCO ₃ ⁻	Bicarbonato
HCl	Ácido clorídrico
HE	Coloração hematoxilina eosina
HMGB1	<i>High mobility group box 1</i>
IL-1 β	Interleucina 1 β
IP ₃	Trifosfato de inositol
IP ₃ R	Receptor de trifosfato de inositol
K ⁺	Potássio
KH ₂ PO ₄	Dihidrogenofosfato de potássio
LOOH	Hidroperóxidos lipídicos
L-NAME	N- ω -Nitro-L-arginina metil éster
LPS	Lipopolissacarídeo
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
MLC	Cadeia leve de miosina
MLCK	Quinase de cadeia leve de miosina
MLCP	Fosfatase de cadeia leve de miosina
mm Hg	Milímetros de mercúrio
MMPs	Metaloproteinases de matriz
MODS	Síndrome da disfunção de múltiplos órgãos

MYPT-1	Unidade regulatória da fosfatase de cadeia leve de miosina
Na ⁺	Sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato-hidrogênio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NOS3	Óxido nítrico sintase endotelial; ou eNOS
NOS2	Óxido nítrico sintase induzida; ou iNOS
NO _x	Nitrato e nitrito
NPS	Nitroprussiato de sódio
NV	Grupo naive
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
ONOO ⁻	Peroxinitrito
pMYPT-1	Unidade regulatória da fosfatase de cadeia leve de miosina fosforilada
PAM	Pressão arterial média
PAMP	Padrão molecular associado a patógenos
PAD	Pressão arterial diastólica
PAS	Pressão arterial sistólica
PBS	Salina tamponada com fosfato
PLB	Fosfolambam
PLC β	Fosfolipase C β
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonilo
PPVR	Pressão de perfusão vascular renal
ROCK	Quinase dependente de Rho; Rho-quinase
RS	Retículo sarcoplasmático
RyR	Receptor rianodina
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SERCA	Ca ²⁺ ATPase no retículo sarcoplasmático
SMTL-B	Esmotelina-B
SO	Grupo <i>Sham-operated</i> (falso operado)
SOD	Superóxido dismutase
S6h	Grupo 6 h após a sepse

S30	Grupo 30 dias após a sepse
S60	Grupo 60 dias após a sepse
S90	Grupo 90 dias após a sepse
SIRS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
T-PER	Reagente de extração de proteína tecidual
TIMP	Inibidores teciduais das enzimas metaloproteinases de matriz
TLR	Receptores do tipo <i>toll</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
U	Unidade
UA	Unidades arbitrárias
UTIs	Unidades de terapia intensiva
V _{1a} R	Receptor para vasopressina tipo V _{1a}
V ₂ R	Receptor para vasopressina tipo V ₂
WB	Western blot
Y-27632	(R)-(+)-trans-4-(1-aminoetil)-N-(4-piridinil)ciclo-hexanocarboxamida

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Curva de sobrevivência.....	38
Figura 2	Aumento dos níveis plasmáticos de nitrato e nitrito (NO_x) na sepse.....	38
Figura 3	Redução na resposta contrátil a vasoconstritores em aorta isolada de ratos sépticos.....	39
Figura 4	Redução na resposta contrátil a vasoconstritores em anéis de aorta de ratos sépticos mantidos em solução nutritiva sem cálcio.....	40
Figura 5	Níveis pressóricos reduzidos e aumento da frequência cardíaca na sepse.....	41
Figura 6	Redução na resposta sistêmica a vasoconstritores na sepse.....	42
Figura 7	Redução no volume urinário nos animais pós-sepse.....	45
Figura 8	Níveis pressóricos reduzidos no pós-sepse.....	45
Figura 9	Níveis aumentados de nitrato e nitrito plasmático no pós-sepse.....	52
Figura 10	Ausência de alteração no fluxo sanguíneo renal (FSR).....	53
Figura 11	Ausência de alteração na pressão de perfusão vascular renal (PPVR) e na reatividade vascular renal a fenilefrina no pós-sepse...	53
Figura 12	Alterações na reatividade vascular renal no pós-sepse.....	54
Figura 13	Valores pressóricos e frequência cardíaca no pós-sepse.....	55
Figura 14	Resposta sistêmica a agentes hipotensores no pós-sepse.....	56
Figura 15	Ausência de alteração na resposta sistêmica à fenilefrina e angiotensina I no pós-sepse.....	57
Figura 16	Alteração na resposta sistêmica à vasopressina e angiotensina II no pós-sepse.....	58
Figura 17	Aumento na reatividade vascular à vasopressina e angiotensina II no pós-sepse.....	60
Figura 18	Aumento na reatividade vascular no pós-sepse em meio livre de cálcio.....	61
Figura 19	Reversão da hiper-contratibilidade vascular à vasopressina e angiotensina II pela taspargina no pós-sepse.....	61
Figura 20	Contração vascular induzida pela vasopressina na presença do antagonista de receptor V_{1a} o DTM-AVP.....	62
Figura 21	Imagens representativas obtidas por WB e análises densitométricas das proteínas $V_{1a}R$ e $V_{2}R$ no pós-sepse.....	62

Figura 22	Contração vascular induzida pela angiotensina II na presença do losartan.....	63
Figura 23	Imagens representativas obtidas por WB e análises densitométricas da proteína AT ₁ R no pós-sepse.....	63
Figura 24	Aumento da contração vascular induzida pela angiotensina II na presença de endotélio no pós-sepse.....	65
Figura 25	Aumento dos níveis de hidropéroxidos lipídicos (LOOH) e glutathiona (GSH) em aorta no pós-sepse.....	67
Figura 26	Redução na atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em aorta no pós-sepse.....	67
Figura 27	Ausência de alteração na atividade das enzimas catalase (CAT) e glutathiona-S-transferase (GST) em aorta no pós-sepse.....	68
Figura 28	Redução na produção ou disponibilidade de O ₂ ⁻ previne a hipercontratilidade em aorta para angiotensina II no pós-sepse.....	69
Figura 29	Níveis aumentados de EROs após estimulação com angiotensina II em aorta no pós-sepse.....	72
Figura 30	Aumento dos níveis de peroxinitrito em aorta no pós-sepse.....	73
Figura 31	Parâmetros histológicos em aorta de animais dos grupos controle (CT) e pós-sepse S60.....	74
Figura 32	Deslocamento para a direita da CE50 induzida pelo composto Y-27632 em anéis de aorta obtidos dos ratos pós-sepse S60.....	76
Figura 33	Ausência de influência da inibição da ROCK na resposta contrátil da angiotensina II no pós-sepse.....	77
Figura 34	Aumento na expressão de Rho-A nos homogenatos aórticos no pós-sepse.....	77
Figura 35	Aumento na expressão de ROCK II nos homogenatos aórticos no pós-sepse.....	78
Figura 36	Expressão de MYPT-1 total nos homogenatos aórticos no pós-sepse.....	78
Figura 37	Aumento na expressão na forma fosforilada da MYPT-1 em homogenatos aórticos no pós-sepse.....	79
Figura 38	Influência do DTT e GM6001 na resposta contrátil à angiotensina II em aorta no pós-sepse.....	82

Figura 39	Efeito do tratamento com doxiciclina na fase aguda da sepse sobre a reatividade vascular à angiotensina II no pós-sepse.....	83
Figura 40	Efeito do tratamento com doxiciclina na fase aguda da sepse sobre a expressão de MMP-2 em aorta no pós-sepse.....	83
Figura 41	Efeito do tratamento com doxiciclina na fase aguda da sepse sobre a atividade da MMP-2 em aorta no pós-sepse.....	84
Figura 42	Efeito do tratamento com doxiciclina na fase aguda da sepse sobre a expressão de MMP-9 em aorta no pós-sepse.....	84
Figura 43	Efeito do tratamento com doxiciclina na fase aguda da sepse sobre a atividade da MMP-9 plasmática no pós-sepse.....	85
Figura 44	Efeito do tratamento com doxiciclina na fase aguda da sepse sobre a expressão de TIMP-1 e 4 em aorta no pós-sepse.....	85
Figura 45	Efeito do tratamento com doxiciclina na fase aguda da sepse sobre a expressão de calponina-1 e SMTL-B em aorta no pós-sepse.....	86
Figura 46	Principais alterações funcionais e moleculares nos ratos sobreviventes à sepse	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Perda de contratilidade vascular a diferentes vasoconstritores durante à sepse.....	40
Tabela 2	Alterações hematológicas em ratos durante a sepse.....	41
Tabela 3	Avaliação da função renal em ratos sobreviventes à sepse.....	46
Tabela 4	Responsividade sistêmica a bradicinina e angiotensina II em ratos sobreviventes a sepse.....	47
Tabela 5	Peso relativo da aorta torácica, rim e coração obtidos de ratos sobreviventes à sepse.....	48
Tabela 6	Reatividade vascular em aorta isolada de ratos sobreviventes à sepse.....	48
Tabela 7	Avaliação do consumo alimentar e hídrico e evolução do peso corporal no pós-sepse – Grupo S60.....	51
Tabela 8	Parâmetros hematológicos e bioquímicos avaliados nas amostras de sangue no pós-sepse.....	52

RESUMO

Dada a complexidade das alterações sistêmicas que ocorrem na sepse severa ou choque séptico, apenas cerca de 30 a 50% das pessoas sobrevivem, se recuperam e recebem alta hospitalar. Entretanto, diversos estudos epidemiológicos revelam que, em poucos anos, o índice de mortalidade dentre aqueles que sobrevivem ao episódio de sepse grave é surpreendentemente maior do que dentre pessoas com a mesma faixa etária que nunca tiveram sepse. Através desse trabalho buscou-se investigar os efeitos tardios da sepse no sistema cardiovascular de ratos machos sobreviventes à sepse induzida pela ligadura e perfuração do ceco (CLP). Em uma avaliação geral dos sobreviventes, em diferentes períodos de tempo (30 a 90 dias após a sepse), encontrou-se redução dos níveis pressóricos e no volume de urina em todos os grupos pós-sepse avaliados. Animais do grupo 60 dias após à sepse (S60), o qual foi selecionado para a continuidade do estudo, apresentaram níveis séricos aumentados de nitrato/nitrito e reatividade sistêmica aumentada à acetilcolina, bradicinina e vasopressina (AVP). A resposta à AVP no pós-sepse também mostrou-se aumentada em rim e aortas testadas *in vitro*. Ao contrário dos efeitos *in vivo* e em rim isolado, nos quais observou-se uma redução de resposta à angiotensina II (AII), um aumento na resposta contrátil foi observado em aorta do grupo pós-sepse S60. O aumento na contração aórtica em resposta à VSP e à AII no grupo pós-sepse S60, em meio livre de cálcio extracelular, foi revertido quando as preparações foram pré-incubadas com tapsigargina, um inibidor da SERCA. O uso de antagonistas para receptores AT₁ da AII (losartan) e V_{1a} da AVP (DTM-AVP) apresentaram efeitos similares em impedir a contração em anéis de aorta obtidos dos grupos CT e pós-sepse S60 à AII e AVP, respectivamente. Não observou-se diferença na expressão destes receptores nos homogenatos aórticos avaliada por imunoeletoforese. O aumento na contração aórtica induzida pela AII no grupo pós-sepse S60 mostrou-se dependente de endotélio e associado a um comprometimento na atividade das enzimas antioxidantes (principalmente uma redução na atividade da superóxido dismutase; SOD), com uma maior produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), detectadas por sonda fluorescente em cortes aórticos estimulados com AII, e de nitrogênio (ERNs) detectadas por imunofluorescência com anticorpo anti-nitrotirosina, um indicativo da produção de peroxinitrito. Quando o efeito contrátil da AII foi avaliado em preparações

aórticas obtidas do grupo pós-sepse S60 na presença de apocinina (inibidor de NADPH oxidase), SOD e tempol (sequestrador de ânion superóxido), a hipercontratilidade para AII foi impedida. Um desvio para a direita na CE50 da curva de relaxamento obtida pelo composto Y-27632 (inibidor da ROCK) foi observado nas aortas dos animais do grupo pós-sepse S60. Além disso, a incubação do mesmo não reduziu a contração induzida pela AII em aortas do grupo pós-sepse S60. Experimentos de imunoelektroforese revelaram um aumento na expressão das proteínas Rho-A, ROCK II e MYPT-1 fosforilada nos homogenatos aórticos obtidos dos ratos do grupo pós-sepse S60, o que em conjunto com os dados funcionais, sugere uma maior atividade da via Rho-A/ROCK na vasculatura dos animais pós-sepse. A incubação de DTT (inibidor da S-glutatioilação) ou GM6001 (inibidor de metaloproteinases de matriz; MMPs) preveniu parcialmente a hipercontratilidade à AII em anéis de aorta do grupo pós-sepse S60. A inibição das MMPs durante a fase aguda da sepse pela doxíciclina (15 mg/kg, 72 h; 1 vez ao dia, v.o.) preveniu a hipercontratilidade à AII. Apesar de não observarmos um aumento estatisticamente significativo na atividade gelatinolítica das MMP-2 e MMP-9, observamos um aumento na expressão destas nos homogenatos aórticos obtidos dos animais do grupo pós-sepse S60, que foi prevenido pelo tratamento com doxíciclina. Nenhuma alteração foi observada na expressão nos inibidores teciduais das MMPs (TIMPs) e nem para possíveis substratos intracelulares de MMPs, como a calponina-1 e a esmotelina-B, em vasos obtidos do grupo S60. Nossos resultados demonstraram que o insulto séptico gera alterações cardiovasculares, incluindo a disfunção endotelial e vascular, que se instalam ou permanecem além do período tradicionalmente avaliado em estudos experimentais. A inter-relação entre o estresse oxidativo, as vias Rho-A/ROCK e MMPs pode explicar, ao menos em parte, a hipercontratilidade à AII em aortas dos animais pós-sepse, a qual pode ser prevenida pelo tratamento com inibidores de MMPs na fase aguda da sepse. A aplicação dos nossos achados para a prática clínica pode criar novas estratégias no manejo da função cardiovascular de pacientes sobreviventes à sepse.

Palavras-chave: angiotensina II, vasopressina, superóxido dismutase, glutatona, peroxinitrito, Y-27632, pMYPT-1, doxíciclina.

ABSTRACT

Given the complexity of the systemic changes that occur in severe sepsis or septic shock, only about 30-50% of people diagnosed survive, recover and are discharged. However, several epidemiological studies reveal that, in a few years, the mortality rate among those who survive severe sepsis is strikingly higher when compared with age-matched people who never had sepsis. This work aimed to investigate the late effects of sepsis in the cardiovascular system of male rats that were subjected to cecal ligation and puncture (CLP) model, and survived to the septic insult. In an overall assessment of survivors at different time points (30 to 90 days after sepsis), it was shown that blood pressure and urine volume were reduced in all post-septic groups. Animals from group 60 days after sepsis (S60), which was adopted to continue the study, showed increased levels of serum nitrate/nitrite and increased systemic reactivity to acetylcholine, bradykinin and vasopressin (AVP). An increased systemic reactivity to AVP was found in the post-sepsis group S60, associated with increased responses in kidney and isolated aortas. While decreased responses were found in systemic reactivity and in kidney to angiotensin II (All), enhanced contractile responses were found in aorta from post-septic rats. The increased effects of AVP and All in aortic rings from S60 group were also found in vessels kept on free calcium solution, and were fully avoided by taspargina, an inhibitor of SERCA. The All AT₁ receptor antagonist losartan and AVP V_{1a} receptor antagonist DTM-AVP displayed similar inhibitory effects on All and AVP-induced contraction in aortic rings obtained from CT and post-sepsis groups. The protein levels of these receptors also remained unchanged in aortic homogenates from S60 animals as detected by immunoblot. All-induced augmented contraction in aortas from S60 group was dependent on endothelium as well as on the impaired activity of antioxidant enzymes, such as reduced activity of superoxide dismutase (SOD). A higher production of reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species were detected by fluorescent probes in aortic tissue from S60 group, stimulated with All or labeling with immunofluorescence antibody against anti-nitrotyrosine, an indicative of peroxynitrite production. When the contractile effects of All in aortic preparations from S60 group were evaluated in the presence of apocynin (NADPH oxidase inhibitor), SOD and tempol (superoxide scavenger), the hyper-contractility to All was avoided. A right shifted concentration response curve of relaxation induced by Y-27632 (a ROCK inhibitor) was found in

aortas from S60 rats. In addition, the incubation of effective concentrations of Y-27632 did not reduce All-induced contraction in post-septic aortas. Immunoblot assays revealed an increased expression of Rho-A, ROCK-II and phosphorylated MYPT-1 in the aortic homogenates obtained from S60 rats, which together with the functional experiments suggest an increased activity of Rho-A/ROCK takes place in the vasculature from post-septic animals. Preincubation with DTT (a S-glutathiolation inhibitor) or GM6001 (a matrix metalloproteinases inhibitor; MMPs) partially prevented the hyper-contractility to All in the aortic rings from S60 group. The treatment with the MMP inhibitor doxycycline (15 mg/kg, 72 h, 1 time per day, p.o.) during the acute phase of sepsis was able to prevent the augmented All-induced contractile effects in aortic rings from S60 group. Although no statistically significant changes have been found in the gelatinolytic activity of MMP-2 and MMP-9 in the aorta of animals from S60 group, we detected increased levels of both MMP-2 and MMP-9, which was abrogated by doxycycline. The expression levels of tissue inhibitors of MMPs (TIMPs), calponin-1 and smoothelin-B (two intracellular targets of MMP proteolysis) remained unaltered in vessels from S60 group. Our results showed that sepsis results in cardiovascular impairments, such as endothelial and vascular dysfunction, that take place or remain beyond the traditional period explored in previous studies. An increased oxidative stress and enhanced activity of the Rho-A/ROCK and MMPs pathways, may explain, at least in part, the increased contractile responses to All found in aortas from S60 rats. The translation of our findings into clinical may open innovative strategies in the management of the cardiovascular function of sepsis-surviving patients.

Key-words: angiotensin II, vasopressin, superoxide dismutase, glutathione, peroxynitrite, Y-27632, pMYPT-1, doxycycline.

1. INTRODUÇÃO

1.1. SEPSE, SEPSE SEVERA E CHOQUE SÉPTICO: EPIDEMIOLOGIA E CARACTERÍSTICAS

A sepse, uma doença inflamatória sistêmica desenvolvida após um insulto infeccioso, bem como suas sequelas, estão entre as causas mais frequentes de mortalidade e morbidade em unidades de terapia intensiva (UTIs) para pacientes adultos (RUSSEL, 2008). Apesar de sua importância e da demanda de recursos, seu reconhecimento muitas vezes ainda não ocorre em tempo hábil, deixando margem para a ocorrência de disfunção de múltiplos órgãos e sistemas (O'BRIEN *et al.*, 2007). O manejo de pacientes com sepse, sepse grave e choque séptico requer abordagem combinada, empregando medidas diagnósticas rigorosas, introdução rápida de antibióticos eficazes e tratamento de suporte (CALANDRA, 2001; DELLINGER *et al.*, 2003), que tem como base a reposição vigorosa de fluidos. Em seguida, os vasopressores são os agentes mais relevantes no suporte hemodinâmico a esses pacientes (BALK, 2004).

A incidência anual é de cerca de 18 milhões de casos de sepse grave no mundo (SALES *et al.*, 2006). As estimativas nacionais são de que, a cada dia, aproximadamente 57 em cada 1000 pacientes das UTIs tem sepse. Destes pacientes admitidos cerca de 9% apresentam choque séptico, a instância mais grave da sepse, onde a mortalidade ultrapassa 50% (ANNANE *et al.*, 2007). Um dos mais importantes estudos epidemiológicos no Brasil, o BASES (*Brazilian Sepsis Epidemiological Study*), que incluiu pacientes de 5 UTIs da região sudeste e sul do país, demonstrou uma incidência de sepse, sepse grave e choque séptico de 46,9%, 27,3% e 23% respectivamente, com uma mortalidade ao final de 28 dias de acompanhamento de 33,9%, 46,9% e 52,2% respectivamente (SILVA *et al.*, 2004). Um outro estudo prospectivo envolvendo 65 hospitais (75 UTIs) de todas as regiões do Brasil, no qual os pacientes que foram admitidos com sepse ou que desenvolveram sepse no mês de setembro de 2003 foram incluídos, revelou que em uma população de 3.128 pacientes, 521 foram diagnosticados como sepse, sepse grave ou choque séptico. A mortalidade global em 28 dias foi de 46,6%. Quando discriminados em sepse, sepse grave e choque séptico, a incidência foi de 19,6%, 29,6% e 50,8% e a mortalidade foi 16,7%, 34,4% e 65,3%, respectivamente (SALES

et al., 2006). Do mesmo modo, um estudo realizado na região sul do Brasil em pacientes com choque séptico admitidos em UTIs, durante os anos de 2003 e 2004, mostrou incidência de 30% e mortalidade de 66,5% (DIAS *et al.*, 2007). Mais recentemente, entre os anos de 2005 e 2009, um estudo foi conduzido na região nordeste do país para traçar a morbimortalidade hospitalar por sepse no Sistema Único de Saúde, o qual constatou 55759 casos de sepse, dos quais 20334 pacientes foram a óbito. A incidência por 100.000 habitantes foi de 21,32 casos, enquanto a mortalidade foi de 7,78 óbitos. Os autores observaram um aumento crescente na mortalidade de acordo com a faixa etária, sendo a faixa de 80 anos com a maior taxa de mortalidade (63,47%). Além disso, a faixa etária com menos de 1 ano foi a que apresentou maior incidência com uma mortalidade em torno de 25% (SILVA *et al.*, 2013).

Estes resultados são superiores aos relatados nas publicações norte-americanas e europeias, que são considerados locais que possuem uma das melhores assistências curativas (SALES JÚNIOR *et al.*, 2006). Nos Estados Unidos são cerca de 750.000 casos de sepse a cada ano com mortalidade em torno de 35 a 45% (ANGUS *et al.*, 2001). Na Europa um estudo multicêntrico realizado em 198 UTIs de 24 países no ano de 2002 (resultados do estudo SOAP: *Sepsis Occurrence in Acutely Ill Patients Investigators*) mostrou uma incidência de sepse de 37%, com uma mortalidade em torno de 32,2 e 54,1% respectivamente para sepse grave e choque séptico (VINCENT *et al.*, 2006).

A incidência em elevação, as novas etiologias e o surgimento em novas populações de pacientes têm sido associados ao envelhecimento populacional, ao aumento do uso de antibióticos mais potentes e de maior espectro, e de agentes imunossupressores, assim como o emprego de técnicas invasivas no tratamento de neoplasias, doenças auto-imunes e transplantes (PÓVOA *et al.*, 2009).

Dessa forma, como se trata de uma doença de alta prevalência mundial e com elevada taxa de morbimortalidade surgiu a necessidade da padronização de critérios diagnósticos, com o objetivo de realizar o diagnóstico precoce, de forma a influenciar na melhora da sobrevida dos pacientes. Com base no *Consensus Conference of the American College of Chest Physicians and the Society of Critical Care Medicine* (tradução livre: Consenso da Conferência do Colégio Americano de Médicos Cardiopneumologistas e da Sociedade de Medicina Intensivista)

(ACCP/SCCM, 1992), e diante da necessidade de se uniformizar os termos relacionados à sepse, foram definidos os seguintes termos:

- SÍNDROME DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA SISTÊMICA (do inglês “*systemic inflammatory response syndrome*” SIRS): resposta inflamatória a uma grande variedade de condições clínicas severas (infecção, hemorragia, trauma, pancreatite, queimadura), caracterizado pela presença de duas ou mais das seguintes manifestações clínicas: i) temperatura $> 38^{\circ}\text{C}$ ou $< 36^{\circ}\text{C}$; ii) frequência cardíaca > 90 bpm; iii) frequência respiratória > 20 ipm ou $\text{pCO}_2 < 32$ mmHg; iv) contagem de glóbulos brancos $> 12.000/\text{mm}^3$ ou $< 4.000/\text{mm}^3$ ou bastonetes $> 10\%$;
- SEPSE: resposta inflamatória a um processo infeccioso, manifestada por duas ou mais condições descritas acima;
- SEPSE GRAVE: é a sepse associada à disfunção orgânica, evidências de hipoperfusão ou hipotensão, e que responde à expansão volêmica isoladamente. A hipoperfusão pode incluir acidose láctica, oligúria ou alteração do estado mental. A hipotensão induzida pela sepse é definida pela pressão sistólica menor que 90 mmHg ou reduzida em 40 mmHg ou mais em relação ao valor basal. Porém, sem a necessidade de agentes vasopressores;
- CHOQUE SÉPTICO: é a sepse grave cursando com hipotensão refratária a expansão volêmica adequada e associada a hipoperfusão ou disfunção orgânica, e com subsequente necessidade de administração de agentes vasopressores;
- SÍNDROME DA DISFUNÇÃO DE MÚLTIPLOS ÓRGÃOS (do inglês “*multiple organ dysfunction syndrome*” MODS): Presença da alteração na função orgânica de modo que a homeostasia não possa ser mantida sem intervenção terapêutica. O processo é contínuo e dinâmico, que pode variar desde disfunção leve até falência total do órgão. Geralmente são utilizados parâmetros de seis órgãos-chave: pulmonar, cardiovascular, renal, hepático, neurológico e coagulação (HEARD & FINK, 1991; VARON & MARIK, 1999; VINCENT & FERREIRA, 2002).

Em 2001 uma nova conferência formada por um grupo de especialistas e líderes de opinião foi realizada (2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference) com o intuito de revisar a definição e critérios diagnósticos definidos na reunião de 1991. No entanto, os participantes concluíram que apesar da expansão na lista de sinais e sintomas da sepse, um reflexo da

experiência clínica, não foram detectadas evidências que apoiassem alterações nas definições já existentes. Da mesma forma, os participantes da conferência concluíram que, até aquele momento, não existiam evidências concretas que permitissem a utilização de biomarcadores para a detecção e/ou diagnóstico da sepse, conclusão que permanece válida até o momento (LEVY *et al.*, 2003).

Ainda nesta reunião um novo sistema de estratificação de risco foi proposto para a classificação da sepse (MARSHALL *et al.*, 2003), o sistema IRO. Este sistema estratifica os pacientes com base na natureza e a extensão do ¹Insulto (no caso de sepse, infecção), magnitude da Resposta do hospedeiro, e do grau de disfunção Orgânica, que mais tarde se tornou PIRO com a adição de Predisposição (ANGUS *et al.*, 2003; VINCENT *et al.*, 2003). Embora interessante e promissora, esta abordagem permaneceu praticamente conceitual, sendo necessário testes e refinamento para melhor aplicação deste sistema na prática clínica (TSIOTOU *et al.*, 2005).

Assim, o paciente séptico é um paciente com síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) de origem infecciosa, embora a SIRS possa estar presente sem sepse, como após trauma, queimaduras, rabdomiólise, pancreatite e pós-operatório de cirurgia cardíaca (BONE *et al.*, 1991; QUENZER *et al.*, 1994).

A disfunção orgânica está presente com muita frequência nos quadros de sepse, acarretando um pior prognóstico e aumento da mortalidade. Ela pode ocorrer por dois modos relativamente distintos, mas não mutuamente exclusivos, denominadas MODS primária e secundária. A MODS primária é aquela que resulta diretamente de um insulto bem definido, na qual a disfunção ocorre precocemente e pode ser atribuída diretamente ao insulto (por exemplo, um politraumatizado com lesão de vários órgãos). Neste caso não há a participação anormal e excessiva da resposta inflamatória sistêmica, gerando as disfunções. Na MODS secundária, o responsável direto não é o insulto sofrido, mas sim a resposta inflamatória que é desencadeada, de forma que as disfunções surgem progressivamente após um evento inicial (é o que ocorre, por exemplo, em infecções não controladas, caso da sepse). A frequência de MODS na população com sepse é estimada em torno de 30%, calculando-se um aumento na mortalidade em 15-20% a cada falência presente, sendo o grupo renal e respiratório os que carregam o pior prognóstico.

¹As letras sublinhadas referem-se à origem da sigla - PIRO.

Quanto maior o número de órgãos e sistemas insuficientes, maior a gravidade. O desequilíbrio final e irreversível entre fatores inflamatórios e anti-inflamatórios, liberados em grande quantidade na corrente circulatória, é responsável pelo choque refratário, falência de múltiplos órgãos e morte (GRIFFITHS & ANDERSON, 2009).

1.2. PARTICIPAÇÃO DA SIRS NA EVOLUÇÃO DA SEPSE À SEPSE SEVERA E AO CHOQUE SÉPTICO

Várias doenças como pneumonia, apendicite e complicações de cirurgias abdominais podem desencadear uma resposta inflamatória sistêmica (SALVEMINI & CUZZOCREA, 2002; HOTCHKISS & KARL, 2003). A sepsé resulta de uma complexa interação entre o microorganismo infectante e a resposta imune, pró-inflamatória e pró-coagulante do hospedeiro, que basicamente se inicia quando os produtos microbianos são reconhecidos pelos leucócitos fagocíticos e outras células do sistema imune através, principalmente, mas não exclusivamente, de receptores de reconhecimento padrão (receptores do tipo toll – do inglês *Toll-like receptors* - TLR) expressos na superfície destas células (POLTORAK *et al.*, 1998; QURESHI *et al.*, 1999). Estes receptores reconhecem estruturas comuns a muitos patógenos microbianos, chamados de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e incluem endotoxinas (lipopolissacarídeo - LPS), peptidoglicano, ácido lipoteicóico, lipopeptídeos, flagelina e RNA viral. O TLR tipo-2 reconhece preferencialmente toxinas de bactérias gram-positivas e o TLR tipo-4 se liga preferencialmente ao LPS de bactérias gram-negativas (NETEA *et al.*, 2004; TREACHER & BROWN, 2009).

Quando um PAMP se liga ao receptor de reconhecimento padrão, diversas vias de sinalização intracelulares são ativadas resultando na ativação de fatores de transcrição (NF- κ B, AP-1, Fos, Jun). Os fatores de transcrição controlam a expressão de genes da resposta imune e a liberação de numerosos efetores moleculares como as citocinas, sendo inicialmente liberados fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-1 beta (IL-1 β), que estimulam uma intensa resposta celular, com liberação de mediadores secundários (fatores de complemento, prostanóides, PAF, EROs), quimiotaxia e ativação de granulócitos (BONE *et al.*, 1991; MOVAT *et al.*, 1987). Os mediadores secundários são responsáveis pela reativação das células fagocitárias e da cascata inflamatória, formando um ciclo vicioso inflamatório. Neutrófilos ativados aderem uns aos outros e ao endotélio da parede vascular, o que provavelmente contribui para o dano

tecidual. Várias citocinas causam, direta ou indiretamente, uma série de alterações a nível celular, primeiro no sistema vascular e imune e em seguida nos tecidos restantes (COHEN, 2009; FANTUZZI *et al.*, 2000), culminando em dano endotelial, formação de fatores quimiotáticos, recrutamento de neutrófilos, oxidação e peroxidação lipídica, dano em DNA e formação de peroxinitrito (GOODE *et al.*, 1995; ZIMMERMANN, 1995). A liberação de mediadores pró-inflamatórios na circulação sistêmica acarreta vasodilatação periférica, desenvolvimento de estado pró-trombótico, liberação de mais mediadores inflamatórios (potencialmente neurotóxicos e com profundos efeitos em astrócitos, neurônios e células endoteliais) e, se o tratamento não for efetivo, disfunção orgânica e morte (NOVACK *et al.*, 2006).

O LPS é um importante componente da membrana de bactérias Gram-negativas, tendo um papel essencial na indução da sepse (ALEXANDER *et al.*, 2001). O LPS liberado na corrente sanguínea é capaz de se ligar a um receptor de membrana de macrófagos/monócitos e neutrófilos, que é uma glicoproteína chamada CD14, seja diretamente ou ligado a uma outra proteína de transporte, chamada LBP (*LPS-binding protein*; em português, proteína de ligação do LPS), que facilita a ligação LPS-CD14. Além disso, CD14 também existe como fração solúvel, podendo reconhecer o complexo LPS-LBP circulante e, assim, se ligar na superfície de células que naturalmente não expressam aquele receptor, como por exemplo células endoteliais. Em altas concentrações, a molécula de LPS pode ligar-se a outros receptores, como TLR-2, CD11 e CD18, ou mesmo ser internalizada através de poros na membrana. Com a formação do complexo LPS-LBP-CD14 na superfície celular há desencadeamento de sinais intracelulares levando à ativação de proteínas quinases (tirosina-quinase, proteína quinase C e A) que por sua vez, ativam fatores de transcrição, dentre eles o fator nuclear kappa B (NF- κ B) e promover a transcrição de várias citocinas inflamatórias (para revisão ver NETEA *et al.*, 2004).

Diante deste contexto, as células mononucleares e polimorfonucleares são estimuladas a secretarem citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , p.ex.), interferon, prostaglandinas, e várias outras substâncias, como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), ânion superóxido (O₂⁻) e o óxido nítrico (NO) (LE-BARILLEC *et al.*, 2005; RAUPACH & KAUFMANN, 2001). Quando estas substâncias são secretadas ocorre uma resposta inflamatória sistêmica exagerada e deletéria, com lesão tissular, ativação

da cascata de coagulação, formação de trombos na microcirculação, hipóxia e acidose teciduais, depressão miocárdica e disfunção múltipla de órgãos (BOCHUD & CALANDRA, 2003).

Um dos efeitos da liberação de IL-1 β e TNF- α é o rompimento do equilíbrio homeostático na manutenção da fluidez sanguínea mediado pelas células endoteliais. Estas citocinas promovem coagulação sanguínea através da expressão de fatores teciduais pró-coagulantes na superfície endotelial, que através de uma série de cascatas proteolíticas, gera trombina e converte fibrinogênio em fibrina (TREACHER & BROWN, 2009). O LPS também estimula as células endoteliais a produzir o fator tecidual (FT), o qual na superfície celular ativa o fator VII, resultando no complexo fator VIIa² e FT que converte o fator X em Xa. Em conjunto com o fator Va, o fator Xa converte a protrombina em trombina. Embora a deposição de fibrina tenha papel importante na homeostasia e na localização de microorganismos, a coagulação intravascular impede a chegada de oxigênio aos tecidos e pode induzir nova lesão inflamatória. Por sua vez, o receptor da trombina ativa o NF- κ B, acarretando a transcrição de genes de mediadores inflamatórios e síntese de NO. A deposição de fibrina é ainda realçada por mediadores vasoativos como a histamina, fator de ativação plaquetária (PAF) e metabólitos do ácido araquidônico. Tanto a IL-1 β como o TNF- α realçam a formação de coágulos por comprometer a via anticoagulante através da inibição da produção de proteína C ativada, que inativa os fatores pró-coagulantes Va e VIIIa (WEILER & RUF, 2008). As concentrações sanguíneas de proteína C ativada e outros inibidores da coagulação, antitrombina III e trombomodulina, são reduzidas na sepse e seus níveis são inversamente relacionados à mortalidade (LIN *et al.*, 2008).

A coagulação intravascular também é aumentada pelo NO, produzido pela isoforma induzida da óxido nítrico sintase (iNOS, também denominada NOS2) no endotélio e células do músculo liso (CAUWELS, 2007). Essa produção excessiva de NO é responsável por boa parte das alterações hemodinâmicas vistas na sepse (FEIHL *et al.*, 2001). Entretanto, estudos clínicos usando um inibidor da NOS aumentaram a mortalidade dos pacientes (LOPEZ *et al.*, 2004). Talvez esse resultado não seja tão surpreendente, uma vez que o NO também inibe a função de neutrófilos além da produção de plaquetas e quimiocinas (CAUWELS, 2007). Outras

² a – ativado.

drogas que falharam em melhorar a sobrevivência dos pacientes com sepse severa incluem os antagonistas de IL-1 β e TNF- α . A falha, nesse caso, possivelmente se deve ao fato dessas citocinas serem liberadas no início da sepse – assim, o êxito do tratamento só é alcançado quando os antagonistas são utilizados no início da sepse, antes que as mesmas desencadeiem as cascatas que levam a todo o espectro da inflamação e disfunção orgânica.

Uma peculiaridade da sepse é o envolvimento de vários órgãos e sistemas. Dentre outros, a sepse pode ocasionar falência renal ou hepática e síndrome de desconforto respiratório agudo (HOPKINS *et al.*, 1999; PAPADOPOULOS *et al.*, 2000), em parte devido a alterações do metabolismo celular que afetam o metabolismo dos lipídios, carboidratos e proteínas. A oferta inadequada de oxigênio aos tecidos em decorrência da queda do fluxo sanguíneo nos capilares e da redução do débito cardíaco contribui para o aumento do metabolismo anaeróbico e a hiperlactatemia. O lactato é comumente utilizado como indicador de hipoperfusão tecidual na sepse. A falta de fornecimento de oxigênio para a célula culmina em uma diminuição da entrada de acetil coenzima A no ciclo do ácido tricarboxílico (WATTS & KLINE, 2003). Como a fosforilação oxidativa falha e o metabolismo de energia se torna dependente da glicólise anaeróbica, a produção celular de lactato aumenta bruscamente, resultando em difusão para o sangue. A concentração elevada de lactato circulante indica oxigenação inadequada tecidual (JONES & PUSKARICH, 2009), podendo estar associada a MODS.

Os mecanismos precisos da disfunção orgânica na sepse, que compreende um espectro variável desde disfunções menores até falência irreversível da função orgânica, não estão completamente elucidados. Além do que, a identificação desta síndrome carrega importante aspecto prognóstico. Independentemente das alterações na oferta de oxigênio e substratos, as células podem reagir à agressão séptica modificando seu comportamento, função e atividade (SINGER *et al.*, 2004).

Exemplos de lesão celular direta implicadas na sepse incluem a peroxidação das membranas lipídicas e dano ou modificação de proteínas (por exemplo enzimas, receptores, transportadores). Surpreendentemente, apesar de todo o exposto, evidência mínima de morte celular é vista em órgãos mais afetados durante a sepse (HOTCHKISS & SWANSON, 1999). Isso pode refletir a progressão da doença, permitindo que fenótipos celulares se adaptem com mais sucesso para um suprimento reduzido de oxigênio e fatores externos prejudiciais. Isto está em

contraste com os insultos cardiorrespiratórios mais abruptos, tais como parada cardíaca ou hemorragia maciça. Como a adaptação celular também vai facilitar a recuperação do processo séptico, já que muitos tipos celulares são poucos regenerativos e sua destruição ou perda permanente impediria a restauração do funcionamento normal dos órgãos e da sobrevivência a longo prazo (SINGER *et al.*, 2004).

A causa mais comum de morte em pacientes com sepse é em decorrência da MODS, onde os órgãos habitualmente envolvidos são pulmões, fígado, rins e coração (incluindo o sistema vascular) (CONNOR *et al.*, 2013; HEARD & FINK, 1991). O pulmão está envolvido no início do processo inflamatório, com a entrada de neutrófilos ativados, edema intersticial, perda de surfactante e exsudato fibrinoso alveolar. Mais tarde, a patologia é caracterizada por infiltrados de células mononucleares, proliferação de pneumócitos tipo II e fibrose intersticial (BELLINGAN *et al.*, 2002). Com as injúrias endoteliais nos alvéolos pulmonares, edemas, hemorragia microvascular, trombose e a perda da substância surfactante podem ocorrer, resultando em hipoxemia profunda, denominada Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (BASSO *et al.*, 2008).

Com a ocorrência da hipotensão arterial, a função hepática pode ter sua capacidade de metabolizar substâncias tóxicas provenientes do intestino diminuída, bem como de endotoxina e/ou de citocinas, levando ao acúmulo das mesmas na circulação sistêmica, agravando o processo inflamatório (CARBONELL *et al.*, 2000; MORENO *et al.*, 1999).

1.3. A FUNÇÃO CARDIOVASCULAR NA SEPSE, SEPSE SEVERA E CHOQUE SÉPTICO

O sistema cardiovascular é um dos mais afetados pela resposta que ocorre na sepse grave e no choque séptico, com a ocorrência de hipotensão arterial (BONE, 1991) e depressão da função miocárdica (PARKER *et al.*, 1984). A maioria dos descritores de disfunção orgânica utiliza a combinação de pressão arterial, frequência cardíaca e uso de drogas vasoativas para caracterizar a gravidade da disfunção cardiovascular.

Um estudo realizado numa população de idosos com choque séptico, sugere que doenças preexistentes, como a doença cardiovascular, contribui para aumento significativo na mortalidade e na evolução para a falência cardíaca, comum nos

quadros de sepse (GODOY, 2003). LEMOS *et al.*, (2005) avaliou a associação da doença cardiovascular (DCV) prévia com a mortalidade de idosos com sepse grave e choque séptico. A média de idade dos pacientes deste estudo foi de 82 anos, onde o diagnóstico predominante foi choque séptico (67%). O número de falências (SOFA³) mostrou-se diretamente relacionado a mortalidade, quando presentes duas ou mais falências orgânicas. E a presença de doença cardiovascular prévia mostrou associação com a mortalidade. Sendo assim, os autores deste estudo sugerem que a presença de DCV, a piora do SOFA nas primeiras 72 horas e a evolução com duas ou mais falências orgânicas se relacionaram com a mortalidade em idosos com choque séptico e sepse grave e deveriam ser estudados como potenciais candidatos para os modelos de predição de óbito nesses pacientes (LEMOS *et al.*, 2005).

Durante as fases iniciais da sepse as alterações circulatórias estão relacionadas principalmente com depleção do volume intravascular que resulta no enchimento insuficiente (pré-carga) do coração, observando-se um aumento do débito cardíaco, associado a elevação da frequência cardíaca, e redução da resistência vascular periférica devido à dilatação sistêmica dos vasos de resistência, estágio conhecido como fase hiperdinâmica do choque séptico. Com a evolução do choque séptico, instala-se um estágio conhecido como fase hipodinâmica, caracterizada pela diminuição do desempenho cardíaco, com redução do débito cardíaco e hipotensão associada à refratariedade a vasoconstritores (ALDERTON *et al.*, 2001; CLOWES *et al.*, 1966). Na tentativa de aumentar o aporte de oxigênio aos tecidos e assim diminuir a produção de ácido láctico e o consequente dano celular, umas das estratégias adotadas na clínica é a infusão de volume com o intuito de aumentar a pré-carga (BRUNNELL & PARRILLO, 1996; PARKER, 1998).

Através de medições diretas da contratilidade cardíaca, pesquisadores mostraram uma redução na fração de ejeção do ventrículo esquerdo, redução na resistência vascular sistêmica e taquicardia compensatória como características da

³O SOFA (*Sepsis-related Organ Failure Assessment*) foi criado em 1995 para a avaliação de morbidade em pacientes sépticos (VINCENT *et al.*, 1996). Com a observação de que seria facilmente aplicável também em quadros diversos da sepse, teve seu nome modificado para *Sequential Organ Failure Assessment*. Formado a partir da soma de alterações em seis diferentes sistemas, trouxe a possibilidade de mensurar a disfunção de órgãos separadamente, assim como notar a eficácia de abordagens terapêuticas voltadas para aquele sistema orgânico.

disfunção cardíaca induzida pela sepse (DELLINGER, 2003). Simultaneamente ocorre a vasodepressão, que é afetada pela combinação de inúmeros fatores (ABRAHAM & SINGER, 2007), dentre eles a produção excessiva de óxido nítrico (NO), ativação dos canais de potássio e alterações nos níveis de hormônios, como o cortisol e a vasopressina. Além disso, a combinação da administração de TNF- α e IL-1 β pode causar depressão miocárdica em concentrações 50 a 100 vezes inferiores às utilizadas quando as mesmas substâncias são administradas individualmente, aproximando-se das concentrações séricas obtidas nos portadores de choque séptico, sugerindo uma ação sinérgica no desencadeamento da depressão miocárdica secundária à sepse (KUMAR *et al.*, 1996). ZHOU *et al.*, (1998) demonstrou ainda que em pacientes sobreviventes a contratilidade e a estrutura cardíaca não estão alteradas de forma significativa mesmo na fase tardia, (hipodinâmica) da sepse, o que sugere que a disfunção cardíaca está relacionada principalmente com a fase inicial do choque séptico nos pacientes sobreviventes.

Além de alterações cardiovasculares como a queda gradual na pressão sanguínea, o choque séptico é associado a uma falta de resposta aos vasoconstritores e uma hiper-reatividade aos vasodilatadores (PARRILLO, 1993). Com o desenvolvimento da resposta inflamatória, há uma vasodilatação periférica acompanhada do aumento na permeabilidade vascular, gerando diminuição do volume intravascular. Com a evolução do processo inflamatório, inicia-se a fase dos efeitos colaterais gerados pela resposta do organismo, como lesões celulares, fechamento do esfíncter pré-capilar, *shunt*⁴ arteriovenoso, vasodilatação, formação de microtrombos leucocitários, agregação plaquetária juntamente com coagulação intravascular disseminada e ativação do sistema retículo endotelial levando a gravíssimas alterações metabólicas (MARIK & VARON, 1998).

Na sepse há importantes alterações no tônus vascular e na densidade de capilares abertos, o que é proporcional à demanda metabólica. Do ponto de vista de orientação do fluxo, existe uma perda importante da modulação do tônus vascular, restringindo a capacidade das arteríolas em direcionar o fluxo, principalmente por perda da capacidade de vasoconstrição. Este fenômeno explica, em parte, a

⁴*Shunt* – São comunicações anormais, isoladas ou múltiplas, causando um desvio de sangue arterial para o território venoso. Alguns estudos sugerem que a densidade de capilares perfundidos está alterada na sepse, onde algumas unidades microvasculares estão hiperperfundidas, possivelmente levando ao *shunt*, enquanto que outras unidades estão hipoperfundidas (ou mesmo sem fluxo) devido à presença de agregados de hemácias e/ou leucócitos (HINSHAW, 1996).

observação concomitante de áreas de hipo e hiperperfusão tecidual (LANDRY & OLIVER, 2001).

O aumento de NO, proveniente principalmente devido à expressão da iNOS, tem papel importante nas disfunções cardíacas e vasculares da sepse, tendo sido bem demonstrado que a hipotensão, a instalação de edema e o aumento da permeabilidade vascular no choque séptico são reflexos da produção elevada de NO, pois sua inibição é capaz de atenuar a hipotensão e outros sintomas do choque em modelos experimentais (THIEMERMANN & VANE, 1990). Além disso, LORENTE *et al.*, (1993) constataram uma nítida relação entre os níveis de nitritos e nitratos (principais metabólitos do NO) com o grau de endotoxemia, com as manifestações clínicas e com as alterações hemodinâmicas nos pacientes estudados. E ainda, preparações com miócitos nos quais se adiciona IL-1 β , observa-se expressão de iNOS e consequente depressão miocárdica, a qual é prevenida com o pré-tratamento com dexametasona, em virtude, ao menos em parte, da inibição da expressão de iNOS (BOOKE *et al.*, 1995; de BELDER *et al.*, 1995).

O NO, após sintetizado, difunde-se para a camada muscular lisa do vaso causando a estimulação da guanilato ciclase solúvel ou citosólica (GCs; STONE & MARLETTA, 1995), gerando um aumento da concentração citosólica do monofosfato cíclico de guanosina (GMPc). Este nucleotídeo ativa a proteína quinase G (PKG) que, dentre outras funções, fosforila a quinase da cadeia leve da miosina (MLCK), tornando-a inativa e provocando relaxamento celular (RAPOPORT *et al.*, 1983; RAPOPORT & MURAD, 1983). Uma segunda via de ação da PKG é a ativação de canais de potássio (K⁺), ocasionando hiperpolarização e consequente relaxamento vascular (FURCHGOTT, 1983).

Além disso, a produção local de NO nos rins, que são particularmente sensíveis às citocinas, está aumentada, resultando em aumento do fluxo sanguíneo renal, particularmente na medula. A ativação da cascata da coagulação, com a subsequente deposição de fibrina, pode estar implicada na disfunção renal induzida pela sepse (ABRAHAM & SINGER, 2007). A insuficiência renal aguda é um evento clínico bastante comum entre os pacientes hospitalizados em unidades de terapia intensiva no qual os eventos de isquemia-reperfusão são considerados a principal causa de dano tecidual e, por conseguinte, da disfunção orgânica (WAN *et al.*, 2003).

1.4. EVIDÊNCIAS CLÍNICAS E EXPERIMENTAIS DE DISFUNÇÕES ORGÂNICAS EM SOBREVIVENTES DE SEPSE SEVERA E CHOQUE SÉPTICO

Dada a complexidade das alterações sistêmicas que ocorrem na sepse, apenas cerca de 40 a 60% das pessoas com sepse severa ou choque séptico sobrevivem, se recuperam e recebem alta hospitalar (ANNANE *et al.*, 2007). Além disso, como abordaremos a seguir, é sabido que a alta letalidade da sepse não se restringe à fase aguda da doença, mas também aumenta o risco de morte ao longo dos anos subsequentes à alta hospitalar.

Um estudo pioneiro conduzido por QUARTIN *et al.*, (1997) avaliou a influência da sepse na sobrevida em longo prazo, ao contrário da maioria dos estudos realizados até então que procuravam identificar a taxa de mortalidade no primeiro mês de acompanhamento ou intra-hospitalar. Tal estudo foi realizado, portanto, após a completa recuperação do quadro séptico e a alta dos pacientes. Os autores utilizaram os pacientes do VACSSS (do inglês: *Veterans Administration Systemic Sepsis Cooperative Study Group*, 1987), randomizados para altas doses de corticóide ou placebo. Foram estudados 1505 pacientes sépticos com acompanhamento por até oito anos após a internação, ou até o óbito. Dentre esses, 675 (45%) apresentaram quadro compatível com sepse grave, e 224 (15%) apresentaram critérios de choque séptico. Dos pacientes com choque séptico apenas 44% sobreviveram após um ano de acompanhamento. Toda a população de pacientes sépticos foi avaliada e apenas 30% dos pacientes sobreviveram ao final de dois anos. Cinco anos após, os sobreviventes de sepse não complicada apresentavam risco elevado de morte, quando comparados com a população controle que nunca teve sepse. Antes de cinco anos de acompanhamento todos os pacientes com choque séptico já haviam falecido e 1.229 dos 1.505 pacientes sépticos tinham falecido após oito anos. Este estudo destacou ainda a prevalência de comorbidades na população séptica, contribuindo juntamente com a sepse para a causa de mortes em longo prazo. Com isso, pode-se sugerir que a sepse é causa de muitas mortes que ocorrem além do período tradicionalmente utilizado nos estudos clínicos e que a análise das intervenções terapêuticas deve considerar esse período, inclusive quando da avaliação da eficiência de um tratamento.

SANDS *et al.*, (1997) também avaliaram pacientes de 8 centros médicos dos EUA após alta hospitalar, onde 1342 pacientes tiveram o diagnóstico de sepse. Os autores descreveram uma taxa de letalidade crescente de 34% para 28 dias e de 45% após 5 meses de acompanhamento. Resultados semelhantes foram encontrados por LAUPLAND *et al.*, (2005), que avaliaram a mortalidade entre pacientes com sepse e choque séptico de UTIs cardiovascular da região de Calgary (AB, Canadá), no espaço de 1 ano após a alta hospitalar. Estes autores concluíram que, com o passar do tempo, os riscos de morte vão aumentando significativamente, atingindo taxas de mortalidade de cerca de 36% para os casos de sepse severa e de 61% para os casos de choque séptico ao longo de 1 ano.

Em um estudo de revisão sistemática que avaliou as similaridades entre a mortalidade em longo prazo e a qualidade de vida no pós-sepse entre diferentes estudos, os autores mostraram que a mortalidade em um ano após a alta hospitalar variou de 7 a 43% em 17 estudos, incluindo acompanhamento de um ano. Em oito destes estudos que compararam pacientes sépticos com uma população livre de infecção, os autores relatam taxas de mortalidade quase duas a cinco vezes mais elevadas nos pacientes sépticos (WINTERS *et al.*, 2010).

No Brasil alguns estudos foram conduzidos para avaliar a qualidade de vida e a mortalidade do paciente após a alta hospitalar dentre eles o desenvolvido por WESTPHAL *et al.*, (2012), onde foram avaliados os pacientes internados com sepse grave ou choque séptico no período de agosto de 2005 a novembro de 2007. Os sobreviventes responderam a um formulário chamado *Short Form-36*⁵, dois anos após a alta hospitalar. O questionário também foi respondido por um grupo controle composto por pessoas da mesma faixa etária que nunca tiveram sepse. Neste estudo, de 217 pacientes com sepse grave ou choque séptico, 112 (51,6%) sobreviveram à internação, sendo que a sobrevida pós-alta hospitalar foi de 41,02% em 180 dias, 37,4% após um ano, 34,3% em 18 meses e 32,3% em dois anos. Por isso, 36 sobreviventes responderam ao *Short Form-36*. Houve comprometimento da qualidade de vida dos sobreviventes em relação ao grupo controle nos domínios: capacidade funcional, vitalidade, saúde mental, dor, estado geral de saúde,

⁵*Short Form-36* - Trata-se de um instrumento genérico de avaliação da qualidade de vida composto por 36 questões, que permite avaliar aspectos de saúde física e mental, subdivididos em oito domínios: capacidade funcional, aspectos físicos, dor, estado geral de saúde, vitalidade, aspectos sociais, aspectos emocionais e saúde mental (CICONELLI *et al.*, 1999).

aspectos físicos e aspectos sociais. Os autores do estudo concluíram que a sepse grave ou choque séptico podem resultar em comprometimento significativo da qualidade de vida, assim como limitar a probabilidade de sobrevida a longo prazo. Resultados similares foram obtidos por CONTRIN *et al.*, (2013), que avaliaram a taxa de mortalidade de pacientes em um ano após alta hospitalar de um hospital de São José do Rio Preto (SP; Centro de Estudos e Pesquisa em Medicina Intensiva), onde os autores constataram que a taxa de mortalidade em um ano após alta hospitalar foi quase duas vezes mais elevada para pacientes com sepse (36,5%) do que para pacientes criticamente enfermos sem sepse (19,7%).

Recentemente um outro estudo publicado por ZHANG *et al.*, (2013) abordou a qualidade de vida a longo prazo em sobreviventes da sepse severa por até 6 anos depois da alta hospitalar. Os autores constataram que, além dos pacientes pós-sepse apresentarem uma sobrevida menor quando comparados com a população controle da mesma faixa etária apresentaram menores *scores* para saúde mental, vitalidade e aptidão física. Estes achados corroboram o estudo de CUTHBERTSON *et al.*, (2013), que mostraram que os pacientes apresentaram uma maior mortalidade após a sepse severa em 5 anos de acompanhamento, com cerca de 30% de mortalidade após a alta hospitalar, bem como com um estudo epidemiológico em larga escala que mostrou que apesar dos avanços do tratamento da sepse e uma melhora na sobrevida na fase inicial, o risco de morte persiste em longo prazo com uma incidência maior nos 3 primeiros meses após a alta hospitalar (PAVON *et al.*, 2013).

Apesar destes achados reforçarem a ideia de que há uma maior probabilidade de óbito em pacientes sobreviventes à sepse, mesmo após a alta hospitalar, estes mesmos estudos não explicam a causa da mortalidade e nem mesmo se esta alta taxa de letalidade está associada com a presença de comorbidades ou à própria exposição do indivíduo à sepse ou ao choque séptico (ANGUS & VAN DER POLL, 2013). Além disso, a maioria dos estudos que avaliaram os resultados da terapia intensiva envolvendo pacientes com sepse leva em conta apenas a mortalidade hospitalar. Permanece a carência de estudos que analisem a qualidade de vida após a alta hospitalar dos pacientes que se recuperaram de quadros sépticos. Apesar do melhor momento para avaliação da sobrevida e qualidade de vida entre os sobreviventes não estar bem estabelecida, a maioria dos estudos sobre esse tema faz a avaliação entre o terceiro mês e um ano

após a alta hospitalar (WINTERS *et al.*, 2010). Nesse aspecto, um período maior de observação poderia revelar de forma mais precisa as consequências da sepse grave e do choque séptico sobre a saúde dos sobreviventes, além de permitir uma melhor avaliação das sequelas e disfunções a longo prazo, o que poderia possibilitar o desenvolvimento de novas estratégias de reabilitação e/ou prevenção.

São escassos os trabalhos clínicos ou experimentais que avaliam as disfunções tardias associadas à sepse, bem como os mecanismos moleculares envolvidos. Dentre os existentes a maioria concentra-se na investigação das alterações cognitivas, pois diversas evidências clínicas mostram que os pacientes que sobrevivem à sepse apresentam comprometimento cognitivo a longo prazo, que incluem alterações na memória, atenção, concentração e/ou perda global de função cognitiva (ANGUS *et al.*, 2001; GRANJA *et al.*, 2004; HEYLAND *et al.*, 2000; HOPKINS *et al.*, 1999). Por isso, BARICHELLO *et al.*, (2005) avaliaram a performance cognitiva de ratos sobreviventes a sepse induzida pela ligadura e perfuração do ceco (CLP), constatando que os animais do grupo séptico apresentavam comprometimento na memória e aprendizado quando comparados ao grupo controle 10 dias após a cirurgia (quando os animais já estavam completamente recuperados, sem sinal de infecção ou alteração motora). Evidências moleculares apontam para o envolvimento do HMGB1 (do inglês, *high mobility group box 1*), um mediador crítico da fisiopatologia na fase aguda da sepse, nestas alterações cognitivas no pós-sepse (CHAVAN *et al.*, 2012; DAL-PIZZOL *et al.*, 2012). O papel do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) nas alterações cognitivas também foi investigado por BIFF *et al.*, (2013), onde os autores demonstraram níveis de BDNF diminuídos no hipocampo de ratos 30 dias após à sepse. Além disso, LEITE *et al.*, (2013) demonstraram que a administração de nicotina, em dose que não alterou a sobrevivência dos ratos submetidos a CLP, foi capaz de melhorar o comprometimento da memória a longo prazo.

Recentemente, WANG *et al.*, (2014) investigaram a hipótese de que pacientes sobreviventes a sepse são mais suscetíveis a infecções recorrentes e morte devido a complicações da infecção. O critério primário foi o número de infecções recorrentes no primeiro ano pós-hospitalização. Os autores constataram que o grupo de sobreviventes à sepse apresentou taxas maiores de infecções, quando comparado ao grupo controle que nunca teve sepse, além de uma taxa de mortalidade de 52,7% contra 12% do grupo controle no primeiro ano pós-

hospitalização. Um trabalho publicado recentemente por PORTELLA *et al.*, (2013) é um dos poucos que se aproxima da hipótese acima mencionada. Os efeitos tardios da sepse sobre a doença renal foram avaliados em camundongos submetidos ao modelo de CLP. Quinze dias após a cirurgia, os camundongos sobreviventes foram submetidos a um segundo insulto renal através de injeções intraperitoneais de albumina sérica bovina por 7 dias. No 22º dia após a cirurgia, os sobreviventes que foram submetidos ao insulto renal apresentaram danos tubulares mais severos quando comparados aos controles, um processo que os autores sugerem estar envolvido com um estado de imunossupressão, devido a concentrações de algumas citocinas renais (como o TNF- α , IL-6, INF- γ) estarem diminuídas e o número de leucócitos aumentado.

Alguns autores sugerem que a resposta imune não resolvida durante a recuperação pode piorar os resultados a longo prazo (MAYR *et al.*, 2014). Por exemplo YENDE *et al.*, (2008) demonstraram que os pacientes apresentavam maiores níveis circulantes de marcadores inflamatórios e de fatores de coagulação no momento da alta hospitalar, mesmo quando clinicamente recuperados da infecção. A maior concentração de IL-6 e IL-10 no momento da alta hospitalar também foi associada com menor sobrevida no 1º ano após alta hospitalar. As causas mais comuns de morte reveladas pelo estudo foram as doenças cardiovasculares e câncer, responsáveis por um terço e um quarto das mortes, respectivamente, seguidas das causas por infecção, falência renal e doença respiratória crônica.

Além disso, um trabalho publicado recentemente por YENDE *et al.*, (2014) averiguou se eventos cardiovasculares poderiam ser uma causa importante para aumentar a mortalidade a longo prazo dos sobreviventes à sepse, uma vez que essas informações eram completamente desconhecidas até o momento. Os principais achados deste estudo mostraram que os eventos cardiovasculares (incluindo infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, ataque isquêmico transitório e revascularização da artéria coronária) eram comuns entre os pacientes que sobreviveram a sepse com uma incidência de aproximadamente 30%, e que estes apresentavam um risco 13 vezes maior de desenvolver um evento cardiovascular, quando comparados com indivíduos que nunca tiveram sepse.

Baseados nestas informações, que mostram que o paciente que teve sepse ou choque séptico, após receber alta hospitalar, persiste com risco

consideravelmente maior de morrer quando comparado a pacientes não sépticos, levantamos a hipótese de que animais sobreviventes à sepse severa/choque séptico apresentam alterações funcionais no sistema cardiovascular, quando comparados com animais que não foram submetidos à sepse.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

- Detectar a existência de alterações na funcionalidade do sistema cardiovascular, bem como mecanismos potencialmente envolvidos em ratos sobreviventes à sepse induzida pela ligadura e perfuração do ceco; e conhecer se tratamentos farmacológicos durante o período de sepse podem impedir os danos funcionais tardios existentes no sistema cardiovascular.

2.2. ESPECÍFICOS

- a) Avaliar nos animais controles (naive e/ou sham) e sépticos 6 horas (S6h) após a CLP: sobrevida, níveis de nitrato/nitrito plasmático, reatividade vascular, pressão arterial e responsividade a vasopressores, e parâmetros hematológicos;
- b) Investigar as possíveis alterações no funcionamento renal através de ensaio de diurese, além dos níveis séricos de ureia e creatinina, 30, 60 e 90 dias após à sepse;
- c) Avaliar as diferenças nos valores de pressão arterial média 30, 60 e 90 dias após à sepse, bem como a responsividade sistêmica para agentes vasoativos;
- d) Obter o peso relativo da artéria aorta, rim esquerdo e coração 30, 60 e 90 dias após à sepse;
- e) Estudar as diferenças na responsividade vascular no modelo de aorta isolada 30, 60 e 90 dias após à sepse;
- f) Obter análise de hemograma e de outros parâmetros bioquímicos, além da evolução do ganho ponderal, do consumo alimentar e hídrico dos animais dos grupos controles e sobreviventes 60 dias após à indução da sepse;

- g) Mensurar o fluxo sanguíneo intra-renal *in vivo* por meio de sistema *laser doppler* nos animais controles e 60 dias após à indução da sepse;
- h) Verificar as alterações na responsividade do rim isolado em animais controles e 60 dias após à indução da sepse;
- i) Determinar as diferenças nos valores de pressão arterial e frequência cardíaca, além da responsividade sistêmica para agentes vasoativos nos animais controle e sobreviventes 60 dias após à indução da sepse;
- j) Estudar a responsividade vascular e investigar as vias que possam estar alteradas na artéria aorta isolada obtida dos animais controles e 60 dias após à indução da sepse;
- k) Avaliar a atividade das enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase e glutathione-S-transferase) e dos níveis de glutathione (GSH) e hidroperoxidação lipídica (LOOH) em aorta obtida dos animais controles e 60 dias após à indução da sepse;
- l) Determinar em tecido aórtico os níveis das espécies reativas de oxigênio basal e estimulada com angiotensina II pela marcação com sonda DHI, além dos níveis de peroxinitrito por imunofluorescência;
- m) Verificar por análise histológica a morfologia e o conteúdo de colágeno em aorta dos animais controles e 60 dias após à indução da sepse;
- n) Investigar a participação da via Rho-A/ROCK na reatividade vascular, bem como na expressão de proteínas importantes para o funcionamento desta via, em aorta no pós-sepse;
- o) Investigar a participação das enzimas metaloproteinases da matriz (MMP) na responsividade vascular em aorta no pós-sepse;
- p) Avaliar se o tratamento com doxiciclina (inibidor de MMPs) durante à sepse pode prevenir as sequelas vasculares observadas no pós-sepse;
- q) Avaliar a existência de alterações na expressão e atividade da MMP-2 em aorta e MMP-9 no plasma dos animais controles e 60 dias após à indução da sepse;
- r) Avaliar a expressão dos inibidores teciduais das MMPs (TIMP-1 e TIMP-4) e de alvos de proteólise intracelular (calponina-1 e esmotelina-B) em homogenatos aórticos obtidos dos animais controles e 60 dias após à indução da sepse.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos, da linhagem *Wistar*, com aproximadamente 3 meses de idade, provenientes do biotério do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e da Universidade de Alberta (UofA)⁶, mantidos a temperatura de 21 ± 1 °C, ciclo claro/escuro de 12/12 h, água e ração a vontade.

Todos os procedimentos aqui descritos foram submetidos à avaliação e aprovados pelos Comitês de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da UFPR (autorização de número 527) e da UofA (autorização de número 329).

3.2. DROGAS E SAIS

Para a execução dos protocolos experimentais foram utilizadas as seguintes drogas e sais: cloreto de sódio (NaCl), cloreto de cálcio (CaCl_2), cloreto de potássio (KCl), sulfato de magnésio (MgSO_4), dihidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4), bicarbonato de sódio (NaHCO_3), D-Glucose, EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), acetilcolina, nitroprussiato de sódio (ambos da Merck; Darmstadt, Alemanha); fenilefrina, N- ω -Nitro-L-Arginina Metil Éster (L-NAME), superóxido dismutase, apocinina, tempol, doxiciclina, bradicinina, acetilcolina, nitroprussiato de sódio, cafeína, angiotensinas I e II, vasopressina, des-Arg9-bradicinina, DTM-AVP (1-fenilacetil,O-Me-D-Tir 2, Arg6,8, Lis9-vasopressina), losartan, tapsigargina, leupeptina, inibidor de tripsina, sucrose e aprotinina, (todos da Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA); composto Y-27632 ((R)-(+)-trans-4-(1-aminoetil)-N-(4-piridinil)ciclo-hexanocarboxamida) (Tocris, Yokohama, Japão), heparina (Cristália, SP, Brasil), xilazina e cetamina (Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brasil), GM 6001 (Chemicom, Temecula, CA, EUA), ditionitrito (DTT; Fisher Scientific, Ottawa, ON, CA), HT-1080 cells (American Type Culture Collection), triton X-100 (Pierce, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA), NaN_3 (Merck & Co, EMD Millipore, Mississauga, ON, CA). Acrilamida, Tris HCl, dodecil sulfato de sódio (SDS), persulfato de amônia (APS), tetrametiletenodiamina (TEMED), reagente de extração de proteína tecidual

⁶Os experimentos realizados na UofA foram os descritos na Parte VI (Item 5.6 dos resultados) deste trabalho.

(T-PER), fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF), o-vanadato (BioRad, Hercules, CA, EUA). Gelatina tipo A de pele suína e azul brilhante de coomassie (G-250; Sigma-Aldrich, Oakville, ON, CA). Tris-glicina, tween-20, brometo hexadeciltrimetilamônio (HTAB), ácido ditionitrobenzóico (DTNB), glutathione (GSH), xilenol, butilhidroxitolueno (BHT), sulfato ferroso (FeSO_4), pirogalol, fosfato dipotássico (K_2HPO_4), 2,4-dinitroclorobenzeno (CDNB), α -naftil, sulfanilamida, ambos adquiridos com grau analítico juntamente com as demais drogas e solventes utilizados neste estudo. Todas as drogas e soluções foram preparadas de acordo com as instruções dos fabricantes.

3.3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

3.3.1. INDUÇÃO DA SEPSE: Modelo de ligadura e perfuração do ceco (CLP – *cecal ligation and puncture*)

Segundo o estudo BASES (*Brazilian Sepsis Epidemiological Study*), que avaliou a epidemiologia e mortalidade da sepse no Brasil, os principais focos de infecção secundária na sepse são a infecção pulmonar, seguida da infecção urinária e abdominal – com incidência superior a 75%. Para nosso estudo optamos por trabalhar com o modelo animal de sepse induzida pela ligadura e perfuração do ceco (CLP), um dos modelos experimentais de sepse mais utilizados na última década e considerado por muitos cientistas um modelo que reproduz no rato, de forma fidedigna, muitas das alterações fisiopatológicas que acometem o homem durante o choque séptico (BURAS *et al.*, 2005; DEITCH, 2005; REMICK *et al.*, 2000; RITTIRSCH *et al.*, 2007).

Como o ceco é uma fonte endógena de contaminação bacteriana, a perfuração do ceco resulta em peritonite bacteriana, seguida da translocação de bactérias entéricas para o compartimento sanguíneo. Sintomas típicos da doença observados em roedores incluem taquicardia, hipotermia, perda de peso e taquipnéia.

A metodologia foi realizada conforme descrito por RITTIRSCH *et al.*, (2009), com algumas modificações. Os animais foram anestesiados com cetamina/xilazina (100/20 mg/kg, i.p.) e submetidos a uma laparotomia com incisão de aproximadamente 2 cm e subsequente exposição e ligadura não-obstrutiva do ceco

(cerca de 75% usando como base a válvula ileocecal), perfurado com agulha 14 ou 18G, seguido de leve compressão para assegurar a saída de conteúdo intestinal. Este procedimento (1 furo 14G) gerou índice de mortalidade em torno de 30% em até 72 horas, com recuperação total do restante dos animais ao longo do período de avaliação, sendo portanto este grupo selecionado para os estudos pós-sepse (então denominados S30, S60 e S90, respectivamente 30, 60 e 90 dias após a sepse). Após a perfuração do ceco o intestino foi recolocado na cavidade abdominal, e a musculatura e a pele do animal foram suturadas. Os animais receberam 30 ml/Kg de solução salina isotônica (via s.c.) para reposição fluídica imediatamente após a cirurgia e foram mantidos em ambiente aquecido até a recuperação completa da anestesia (60 a 120 minutos). Os animais do grupo controle não foram submetidos a qualquer procedimento cirúrgico, sendo então denominados grupo *naive* (CT). Outros, denominado grupo falso operado (*sham-operated*; SO) foram submetidos aos mesmos protocolos do grupo CLP com exceção da ligadura e perfuração do ceco.

Em um outro bloco experimental, foram realizadas avaliações 6 horas após a cirurgia de CLP sendo esse grupo chamado de S6h, cujo protocolos incluíram a determinação dos níveis de nitrato/nitrito plasmático, reatividade vascular, hemograma e medida direta da pressão arterial.

Por fim, em um outro bloco experimental, 2 horas antes da CLP ou *sham-operated*, os ratos receberam por via oral o tratamento com doxiciclina na dose de 15 mg/kg ou somente veículo (CMC 0,5%). O tratamento foi repetido em 24 e 48 horas após a primeira administração. Para estes grupos experimentais foram realizados os seguintes protocolos 60 dias após: reatividade em aorta isolada, western blot e zimografia.

Após o retorno na anestesia, os animais de ambos os grupos (para o estudo do pós-sepse) foram acompanhados a cada 12 horas, durante 120 horas. Somente aqueles animais que não morreram em função do procedimento cirúrgico direto ou da anestesia foram considerados para fins de índice de mortalidade.

3.3.2. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE NITRATO/NITRITO (NO_x)

Amostras de sangue foram coletadas pela veia cava de animais anestesiados dos grupos controle (naive e *sham-operated*), sepse 6 h (S6h) e sobreviventes (grupo 60 dias; S60). O sangue foi acondicionado em tubos e centrifugados a 1.000 g (10 minutos, 4 °C) para separação do plasma. As amostras foram aliquotadas e armazenadas em freezer -70 °C até a realização das dosagens. As amostras foram desproteinizadas com sulfato de zinco diluído 1:1 com água Milli-Q. Para a conversão do nitrato a nitrito, as amostras de plasma foram incubadas, a 37 °C durante 3 horas em presença da nitrato redutase expressa em *E. coli*. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas para a remoção da bactéria. Em seguida 100 µl do sobrenadante misturados com o mesmo volume de reagente de Griess (1% de sulfanilamida em 10% de ácido fosfórico/0,1% de alfa-naftil-etilenodiamina em água de Milli-Q) foram colocados em placas de 96 poços para leitura a 540 nm em um leitor de placas. Curvas padrão de nitrito e nitrato (0 a 150 µM) foram realizadas simultaneamente.

3.3.3. DETERMINAÇÃO DA REATIVIDADE VASCULAR EM MODELO DE AORTA ISOLADA

Os animais foram anestesiados com cetamina/xilazina (100/20 mg/kg, i.p.) antes do procedimento. A aorta torácica descendente foi retirada, tendo seu tecido conectivo removido. Em seguida, o vaso foi seccionado em anéis medindo aproximadamente cinco milímetros de comprimento. Esses anéis foram acondicionados, através de hastes conectadas a transdutores, em cubas de vidro contendo solução nutritiva de Krebs em mM: NaCl 110,8, KCl 5,9, NaHCO₃ 25, MgSO₄ 1,07, CaCl₂ 2,49, KH₂PO₄ 2,33 e glicose 11,51, constantemente aerada com carbogênio (95% O₂/5% CO₂), mantidos a uma temperatura de 37 °C e submetidos a tensão basal de 1 g. Os registros foram obtidos por meio de transdutores isométricos, acoplados a um amplificador de sinais (Modelo ML 130, ADI Instruments, Austrália) conectados a um computador contendo um software específico de integração (Chart v7.00, PowerLab, ADI Instruments, Austrália).

Foi adotado um intervalo de uma hora com trocas da solução nutritiva a cada 15 min, para estabilização das preparações. Após os sessenta minutos, a

preparação foi contraída com solução de cloreto de potássio (KCl – 60 mM). Após um novo intervalo de 30 minutos para estabilização das preparações, foi induzida nova contração por fenilefrina 1 μ M, seguida de administração de acetilcolina 1 μ M, para obtenção de relaxamento, indicando a presença de endotélio funcional ou ausência do mesmo, naqueles experimentos realizados com aorta desprovida de endotélio. Foram considerados vasos com endotélio funcional aquelas preparações que obtiveram um relaxamento igual ou maior a 80%.

Em seguida à verificação da integridade do endotélio, um novo período de estabilização foi aguardado e os anéis de aorta foram expostos a concentrações crescentes cumulativas (curvas concentração resposta - CCRs) aos seguintes agentes: fenilefrina (1 nM – 3 μ M), angiotensinas I e II (1 nM – 1 μ M), vasopressina (1 nM – 3 μ M), acetilcolina (1 nM – 3 μ M), nitroprussiato de sódio (1 nM – 3 μ M) e composto Y-27632 (3 nM – 30 μ M). Os efeitos de CCRs para a angiotensina II também foram avaliados em preparações previamente incubadas (durante 30 min) com L-NAME (um inibidor não seletivo das NO sintases; 100 μ M), apocinina (um inibidor da NADPH oxidase; 1 mM), superóxido dismutase (SOD; 300 U/mL), tempol (sequestrador de ânion superóxido; 0,3 mM), Y-27632 (um inibidor não seletivo da Rho-kinase; 0,3 μ M), losartan (um antagonista de receptor AT₁ da angiotensina II; 1 μ M); DTT (inibidor da S-glutatioação; 1 mM) e GM6001 (inibidor das enzimas metaloproteinases de matriz; 30 μ M). O efeito de CCRs para a vasopressina também foi avaliado em preparações previamente incubadas (durante 30 min) com DTM-AVP (um antagonista de receptor V_{1a} da vasopressina; 1 nM)

Para avaliar a contratilidade em resposta ao cálcio, preparações sem endotélio funcional foram mantidas em solução nutritiva despolarizante sem cálcio (60 mM). Após uma hora os tecidos foram expostos a CCRs de cloreto de cálcio (CaCl₂) (10 μ M – 100 mM). Em outras preparações, a reatividade à angiotensina II (10 μ M), vasopressina (1 μ M) e cafeína (1 mM) foram avaliadas em preparações previamente incubadas durante 15 min em solução nutritiva zero cálcio. Os efeitos para a angiotensina II e vasopressina também foram avaliados em preparações previamente incubadas (durante 30 min) com tapsigargina (um inibidor da SERCA; 1 μ M). Os resultados obtidos foram comparados entre os grupos e expressos como delta da contração ou porcentagem de relaxamento.

3.3.4. HEMOGRAMA

O sangue dos animais dos grupos CT, S6 h e S60 foram coletados pela veia cava e armazenado em tubos contendo ácido etilenodiaminotetracético disódico (EDTA) a 5%. As amostras foram imediatamente submetidas a análise em contador hematológico automatizado modelo Horiba (ABX®, Micros 60, Montpellier, França). Os resultados foram expressos por μl /amostra, com exceção do hematócrito que foi expresso em porcentagem.

3.3.5. REGISTRO DIRETO DA PRESSÃO ARTERIAL EM RATOS ANESTESIADOS

Os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina (100 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg), administrada pela via intramuscular e suplementada a intervalos de 45-60 minutos. Após a fixação do animal em decúbito ventral, a veia femoral esquerda foi localizada e dissecada para inserção de uma agulha conectada a um cateter de polietileno (PE 10), destinado à administração das drogas e soluções empregadas neste estudo. Imediatamente após a canulação da veia femoral, 3 UI de heparina, diluída em solução salina, foi administrada para prevenir coágulos e obstrução das cânulas. Todos os animais foram submetidos à traqueostomia e mantidos sob respiração espontânea. A artéria carótida esquerda foi localizada e cuidadosamente isolada do nervo vago e tecidos adjacentes. Com auxílio de linha de sutura, o fluxo sanguíneo da artéria carótida foi interrompido na sua extremidade distal, enquanto o fluxo em sua extremidade proximal foi temporariamente suprimido pela compressão com uma pinça curva. Utilizando-se uma tesoura oftalmológica, um pequeno corte foi realizado na região medial da porção da artéria carótida clampeada, servindo como via para inserção de um catéter de polietileno (PE 20), devidamente heparinizado, que foi firmemente conectado à artéria e a um transdutor de pressão. Ao final dos experimentos, todos os animais foram mortos através de uma overdose de tiopental (superior a 40 mg/Kg, i.v.).

Os registros foram obtidos por meio de transdutores de pressão acoplados a um amplificador de sinais (Modelo ML 130, ADI Instruments, Austrália) conectados a um computador contendo um software específico de integração (Chart v7.00, PowerLab, ADI Instruments, Austrália).

Os níveis de pressão sistólica (PAS), diastólica (PAD), média (PAM) e frequência cardíaca (FC) foram mensurados continuamente ao longo dos experimentos.

Transcorrido o tempo de estabilização de 20 minutos foi feita a administração intravenosa de fenilefrina (3 – 30 nmol/kg) e angiotensina II (3 – 30 pmol/kg), com intervalos de 10 a 15 minutos entre cada dose, para os grupos 6 horas; bradicinina (3 – 30 nmol/kg) e angiotensina II (3 – 30 pmol/kg), com intervalos de 10 a 15 minutos entre cada dose, para todos os grupos do pós-sepse; e os demais agentes vasoativos: fenilefrina (3 – 30 nmol/kg), vasopressina (3 – 30 pmol/kg), angiotensinas I e II (3 – 30 pmol/kg), acetilcolina (3 – 30 nmol/kg), nitroprussiato de sódio (3 – 30 nmol/kg), bradicinina (3 – 30 pmol/kg) e des-arg9-bradicinina (100 nmol/kg) para os grupos 60 dias. Todas as doses administradas foram preparadas em solução salina em um volume final de 200 µl.

3.3.6. AVALIAÇÃO DA DIURESE

Para a determinação da diurese os animais dos grupos controle e pós-sepse (S30, S60 e S90) foram mantidos em gaiolas metabólicas durante 8 h e o volume de urina medido a cada 2 h. Após este período, a excreção cumulativa da urina foi calculada em relação ao peso corporal e expressa como ml/100g de peso corporal. As concentrações de eletrólitos (Na^+ , K^+ , Cl^- e HCO_3^-), pH e densidade foram determinadas em cada amostra de urina coletada durante o período. Os níveis de sódio e potássio foram quantificados por espectrofotometria de chama e as concentrações de cloreto e bicarbonato foram quantificadas por argentimetria (titulação). O pH foi determinado nas amostras de urina imediatamente após a coleta usando um pH-metro (HI-8424, Hanna Instruments). A densidade foi determinada pelo peso da amostra em balança analítica (Mettler AE 163).

3.3.7. DOSAGENS BIOQUÍMICAS

Foram realizadas as dosagens plasmáticas de ureia, creatinina, ácido úrico, aspartato transaminase (AST) e alanina transaminase (ALT) utilizando-se kits comerciais (Bioclin, Belo Horizonte, MG), conforme orientações do fabricante. Para isto, o sangue foi coletado pela veia cava dos animais previamente anestesiados com cetamina/xilazina (100/20 mg/kg, i.p.), acondicionado em tubos contendo

anticoagulante (conforme instrução do fabricante) e centrifugados a 1.000 *g* (10 minutos, 4 °C) para separação do plasma. As amostras de plasma foram aliquotadas e armazenadas em freezer -20 °C até a realização das dosagens. Os resultados obtidos entre os diferentes grupos foram comparados e analisados através de testes estatísticos.

3.3.8. AVALIAÇÃO DO PESO RELATIVO DA AORTA, RIM E CORAÇÃO

Foram determinados o peso relativo da aorta torácica (com completa remoção do tecido conectivo), rim (excluindo a supra-renal e gorduras adjacentes) e coração (após separação completa dos átrios e grandes vasos) dos animais controles e pós-sepse, S30, S60 e S90, utilizando-se balança analítica (Shimadzu, AY220). Os resultados foram expressos como peso do tecido por 100 g de peso do animal.

3.3.9. AVALIAÇÃO DO GANHO PONDERAL, CONSUMO ALIMENTAR E HÍDRICO

A pesagem dos animais foi realizada através de uma balança digital com precisão de 1 g. Os animais foram pesados semanalmente por 2 meses, período este em que também foi avaliado o consumo alimentar (através da pesagem da ração) e do consumo de água (medido com o auxílio de provetas graduadas), de ambos os grupos.

3.3.10. FLUXO SANGUÍNEO RENAL

Esses experimentos foram realizados simultaneamente ao registro direto da pressão arterial conforme o descrito por FLEMMING *et al.*, (2000), com algumas modificações. Em animais anestesiados, após a canulação da veia e artéria que foram utilizados para a injeção de drogas e o registro da pressão arterial, uma incisão foi realizada na região média do abdome, o intestino foi cuidadosamente deslocado, permitindo a visualização do rim direito. Para medida do fluxo sanguíneo cortical renal, uma *probe* de fibra ótica (DP2b, Moor Instruments) conectada a um sistema *Laser Doppler* (MoorVMS-LDF, Moor Instruments, Inglaterra) foi colocada sobre a superfície ventral do rim e protegido com gazes umedecidas em solução

salina estéril. O sistema *Laser Doppler* fornece um sinal, em unidades de fluxo, proporcional ao produto da velocidade de hemossedimentação e concentração num pequeno volume de tecido. Um período de 20 min de estabilização foi aguardado e os valores de fluxo sanguíneo real basal obtidos foram obtidos e comparados entre os grupos (60 dias após a sepse).

3.3.11. RIM ISOLADO

Para avaliarmos a resposta do leito vascular renal a agentes vasoativos utilizamos a metodologia de isolamento e perfusão de rins em sistema aberto, o que significa dizer que a solução nutritiva perfunde o leito vascular renal uma única vez, sendo descartada imediatamente. O sistema de perfusão consiste em cinco elementos básicos: i) um sistema de aquecimento, o qual é composto por banho-maria mantido a 37 °C e associado a uma bomba d'água portátil; ii) uma bomba peristáltica com um sistema de controle da velocidade de solução nutritiva; iii) um transdutor de pressão; iv) uma cuba de 100 ml para órgão isolado, na qual o rim fica mergulhado em solução nutritiva aquecida durante todo o período de experimento e, v) uma cuba de vidro dotada de um sistema de cata-bolhas, de uma serpentina para o aquecimento da solução nutritiva utilizada para a perfusão e ainda três diferentes saídas, a primeira para a perfusão do rim, a segunda para a conexão com o transdutor de pressão e a terceira para a injeção de drogas no sistema.

A velocidade de perfusão mantida pela bomba peristáltica durante todo o experimento foi de 4 ml/min (valor previamente determinado no laboratório e similar ao descrito na literatura). Um filtro de vidro polimerizado foi acoplado ao sistema de perfusão para evitar que pequenas partículas presentes na solução nutritiva obstruíssem a circulação do leito vascular renal.

Para evitar o aparecimento de coágulos no leito vascular renal durante o procedimento de isolamento e perfusão do rim, os animais foram previamente tratados com heparina (30 U.I., i.p.) 5 a 10 minutos antes da administração do agente anestésico.

Os animais foram submetidos a anestesia profunda com uma mistura de cetamina/xilazina (100/20 mg/kg, i.p.) antes do procedimento. Uma laparotomia foi realizada, permitindo o acesso a todas as vísceras do animal. Em seguida, o intestino foi cuidadosamente deslocado para o lado direito, permitindo a visualização

do rim esquerdo e dissecação da artéria aorta abdominal. Durante estes procedimentos as vísceras e, especialmente o rim esquerdo, foram mantidos umedecidos com uma gaze cirúrgica embebida em solução nutritiva de Krebs-Henseleit. Com o auxílio de um fio cirúrgico o ureter esquerdo foi ligado, impedindo o fluxo urinário e, conseqüentemente, a produção de urina pelo rim (o que garante a obtenção de um rim não funcional, porém com o sistema vascular perfeitamente responsivo durante um período de até 3 h, suficiente para a realização dos protocolos experimentais). Um fio cirúrgico foi posicionado na artéria aorta abdominal, entre a artéria renal direita e a esquerda, para direcionar o fluxo sanguíneo somente para o lado esquerdo. O fluxo sanguíneo na artéria aorta foi interrompido abaixo da artéria renal direita, sendo que em nenhum momento o rim esquerdo foi exposto a qualquer processo isquêmico. Em seguida, um pequeno corte foi realizado na artéria aorta, permitindo a inserção de um catéter que foi direcionado até as proximidades da artéria renal esquerda e fortemente fixada à artéria aorta com o auxílio de fios cirúrgicos. O fio cirúrgico anteriormente posicionado na artéria aorta abdominal foi ligado, interrompendo o fluxo renal, e a bomba peristáltica de perfusão foi acionada iniciando-se o processo de perfusão. O rim, em processo contínuo de perfusão, foi removido, assim como sua gordura adjacente e sua glândula supra-renal, para evitar a influência da adrenal sobre o leito vascular renal durante o período de experimentação. Em seguida, o rim foi acondicionado em uma cuba contendo 100 ml da solução nutritiva de Krebs-Henseleit (composição conforme descrito no protocolo de aorta isolada), em um sistema mantido à temperatura de 37 °C, constantemente aerado com mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂) sob um fluxo constante de 4 ml/min desta mesma solução. Um período de 1 hora foi aguardado antes do início da avaliação experimental. O registro da pressão de perfusão foi feito através de um transdutor de pressão acoplado ao sistema de perfusão, interligado a um polígrafo computadorizado (Chart v7.00 ADI Instruments, Austrália).

As respostas a fenilefrina (30 nmol), vasopressina (3 – 30 pmol) e angiotensina II (10 – 100 pmol), administradas em doses não cumulativas e com um intervalo de 10-15 min, foram avaliadas e comparadas entre os grupos controle e pós-sepse (S60), assim como a determinação dos valores de pressão de perfusão vascular renal basal (PPVR).

3.3.12. DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE HIDROPERÓXIDOS LIPÍDICOS (LOOH)

A determinação de LOOH foi realizada em amostras de aorta de animais dos grupos CT e S60 pelo método de FOX2, conforme descrito por JIANG *et al.*, (1991). Os tecidos foram homogeneizados em metanol (P.A. 1:4), centrifugados por 20 min (9.7 rpm, 4 °C) e o sobrenadante armazenado. O reagente de FOX2 foi preparado pela dissolução de xilenol laranja (1 mM), H₂SO₄ (25 mM), FeSO₄. NH₄ (250 mM) e BHT (4 mM) em metanol 90%. Alíquotas do sobrenadante (60 µl) foram adicionadas ao reagente de FOX2 (240 µl) e incubadas a temperatura ambiente por 30 min e na sequência foi realizada a leitura da absorbância a 560 nm. O método consiste na oxidação do íon ferroso em íon férrico pelos LOOH sob condições ácidas, formando um complexo com o xilenol laranja visualizado pela geração de um complexo azul púrpura. Os valores de LOOH foram expressos como µmol/mg de tecido.

3.3.13. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA (GSH)

Os níveis de grupos sulfídricos não proteicos (GSH) foram determinados em amostras de aorta coletadas dos ratos dos grupos CT e S60, conforme o método descrito por SEDLAK & LINDSAY (1968). Os tecidos foram pesados e homogeneizados com tampão fosfato de potássio (200 mM, pH 6,5). Foi realizada a adição de 40 µl de ácido tricloroacético (12.5%) a 50 µl do homogenato seguido da centrifugação por 15 min (3000 rpm, 4 °C). Em seguida, 10 µl do sobrenadante de cada amostra foi incubado em placa de 96 poços com tampão Tris-HCl (290 µl; 0,4 M, pH 8,9) e 5 µl de DTNB (5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico 0,01 M). Uma curva padrão de GSH foi obtida como controle e para o cálculo dos valores. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata. A leitura da absorbância foi realizada a 415 nm. Os valores de GSH foram expressos como µg de GSH/g de tecido.

3.3.14. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

A atividade da SOD foi determinada em amostras de aorta coletadas dos ratos dos grupos CT e S60, conforme metodologia descrita por MARKLUND & MARKLUND (1974), a qual baseia-se na capacidade da SOD em inibir a auto

oxidação do pirogalol. Para isto, alíquotas dos sobrenadantes (20 µl) obtidos com a homogeneização dos tecidos em tampão fosfato de potássio (200 mM, pH 6,5) foram adicionadas a tubos contendo pirogalol (25 µl; 1 mM) e solução tampão de Tris HCl-EDTA (443 µl; 200 mM, pH 8.5), e misturados em vórtex por 1 min. Após 20 min de incubação em temperatura ambiente, a reação foi interrompida com a adição de 12,5 µl de HCl 1N. A mistura foi centrifugada por 4 min (14.000 rpm, 4 °C) e 300 µl deste sobrenadante pipetados em microplaca. A leitura da absorbância foi realizada a 440 nm. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata. Os resultados foram comparados com o controle (Tampão Tris-EDTA com pirogalol sem incubação + média sem amostra e sem incubação), sendo este valor igual a 100%. A quantidade de proteína que inibe a reação em 50% (IC50) equivale a 1 unidade (U) de SOD. Os valores de SOD foram expressos como unidade (U) de SOD/mg proteína.

3.3.15. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CATALASE (CAT)

A atividade da CAT foi mensurada de acordo com o método descrito por AEBI (1974), que consiste na determinação da taxa constante da decomposição do peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Para cada um dos tubos numa série de 3 por amostras, 20 µL da amostra homogeneizada em tampão fosfato pH 6,5 ou água destilada (branco) foram adicionadas a 980 µL de uma solução reação 20 mM (tampão Tris-EDTA 5 mM, pH 8.0, H₂O₂ 30% e água milli-Q). A taxa constante foi determinada pela medida da alteração da absorbância (240 nm) por minuto. Os valores da atividade da CAT foram expressos como µmol CAT/min/mg proteína.

3.3.16. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST)

A atividade da GST foi determinada segundo o método descrito por HABIG *et al.*, (1974), consistindo basicamente na conjugação do 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) com o GSH produzindo um dinitrofeniltioeter. Foi adicionado 200 µl do reagente (3 mM CDBN diluído em etanol PA e 3 mM GSH diluído em tampão fosfato) a 100 µl da amostra (sobrenadante obtido com a homogeneização dos tecidos em tampão fosfato de potássio 200 mM, pH 6,5). A leitura da absorbância foi realizada a 340 nm em intervalos de 10 s durante 1 min.

Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata. Os valores de GST foram expressos em nmol/min/mg de proteína.

3.3.17. IMUNOELETROFORESE

A aorta dos animais controle e sobreviventes à sepse (60 dias após) foram removidas após perfusão para remoção do excesso de sangue e congelados em nitrogênio líquido e mantidas a -80 °C até o momento do processamento. Aproximadamente 100 mg de tecido foram congelados em nitrogênio líquido, pulverizados e misturados a 200 µl de tampão de lise (50 mM tampão Tris-HCl, pH 7.4) contendo 3,1 mM sucrose, 1 mM dithiothreitol (DTT), 10 µg/ml leupeptina, 10 µg/ml de inibidor de tripsina (soybean), 2 mg/ml de aprotinina e 0,1% Triton X-100) (Sigma, St. Louis, MO, EUA). As amostras foram sonicadas por 10 s e mantidas em gelo durante 1 h. O tecido lisado foi centrifugado a 15000 rpm durante 30 min. O sobrenadante foi coletado e usado nos nossos experimentos. A medida do conteúdo total de proteínas nas amostras foi realizada pelo método de BCA, utilizando um kit comercial, conforme instruções do fabricante (Pierce Chemical, Rockford, IL, EUA). Alíquotas contendo 40 µg de proteínas foram submetidas a eletroforese em gel dodecil sulfato-poliacrilamida (SDS-PAGE) 7, 10 ou 12%, de acordo com o peso molecular desejado, e transferido para membranas de nitrocelulose (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). As membranas foram lavadas por 1 h em solução tampão salina-Tris (TBS) contendo Tween 0,05%, bloqueada em leite 5% preparado em solução TBS-Tween. Em seguida, foram expostas aos anticorpos primários contra β -actina (1:25000, Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA), Rho-A (1:200, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA), ROCK I (1:500, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA), ROCK II (1:500, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA), MYPT-1 (1:500, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA), fosfo-MYPT-1 Thr 696 (1:250, Millipore), fosfo-MYPT-1 Thr 850 (1:250, Millipore), AT₁R (1:100, Santa Cruz, Dallas, TX, USA), V_{1a}R (1:100, Santa Cruz, Dallas, TX, USA), V₂R (1:100, Santa Cruz, Dallas, TX, USA), calponina-1 (1:500, Santa Cruz, Dallas, TX, USA), esmotelina-B (1:500, Abcam), MMP-2 (1:1000, EMD Millipore, Mississauga, ON, CA), MMP-9 (1:1000, EMD Millipore, Mississauga, ON, CA), TIMP-1 (1:500, Calbiochem, EMD Millipore, Mississauga, ON, CA) e TIMP-4 (1:500, Chemicon, Temecula, CA, USA). A exposição aos anticorpos primários foi realizada *overnight* a 4 °C, sob agitação constante. Após,

as membranas foram lavadas em solução TBS-Tween durante 30 min e incubadas com anticorpos secundários (anti-camundongo ou anti-coelho quando aplicáveis) conjugados a peroxidase. A imunoreatividade foi detectada por quimioluminescência ou revelador automático (Bio-Rad, modelo ChemiDoc™ MP System 170-8280, Hercules, CA, EUA). As bandas foram quantificadas por densitometria utilizando o programa Image J 1.41 (NIH, USA) e os resultados expressos em unidades arbitrárias em relação à β -actina.

3.3.18. MEDIDA DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs) POR SONDA FLUORESCENTE

O conteúdo total de EROs foi determinado por microscopia de fluorescência através do monitoramento da oxidação do *5,6-dihydroxyindole* (DHI) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA; Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Para estes experimentos, as aortas isoladas dos grupos controles (CT) e sobreviventes 60 dias após a indução da sepse (S60), foram dissecadas, emblocadas em *Tissue-Tek* e congeladas. Os cortes de 7 μ m (criostato) foram alocados em uma lâmina de microscopia previamente recobertas com gelatina estéril (0,5%, v/v). Em seguida os cortes aórticos foram demarcados com caneta hidrofóbica e incubados com a sonda fluorescente DHI por um período de 30 min a 37 °C, protegidas da luz. Após este período os cortes foram lavados com solução de Hanks (concentração em g/L: fosfato de potássio 0,06; cloreto de potássio 0,4; fosfato de sódio dibásico heptahidratado 0,09; cloreto de sódio 8,0; D-glicose 1,0; vermelho de fenol 0,011; bicarbonato de sódio 0,35) e as lâminas montadas com meio de montagem (Gel Mount – Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA). Em outro grupo experimental, após carregamento com DHI os cortes foram estimulados com angiotensina II (40 μ M) ou veículo por 30 min a 37 °C. Ao final dos tempos de incubação os cortes foram lavados com solução de HanKs, as lâminas montadas com meio de montagem e levadas ao microscópio (Olympus IX71, Tóquio, Japão). As imagens foram adquiridas com uma câmera acoplada ao microscópio, objetiva de 40x, no comprimento de onda de excitação de 500 nm e emissão de 536 nm. A intensidade de fluorescência foi quantificada usando o software Image J 1.41 (NIH, USA).

3.3.19. MARCAÇÃO DOS NÍVEIS DE PEROXINITRITO POR IMUNOFLOURESCÊNCIA

As aortas torácicas obtidas dos animais controle e pós-sepse (S60) foram dissecadas, emblocadas em *Tissue-Tek* e congeladas. Os cortes de 7 µm (criostato) foram dispostos em uma lâmina de microscopia previamente gelatinizadas (0,5%, v/v) e fixadas em acetona P.A. por 10 minutos a temperatura ambiente. As lâminas tiveram a área a ser aplicada o anticorpo delimitada com uma caneta hidrofóbica. Foram então permeabilizadas com PBS-tween 0,5% por 20 minutos e em seguida lavadas 3 vezes (de 5 minutos cada) com PBS-tween 0,1% sob agitação. Os cortes foram cobertos com uma solução de soro fetal bovino 5% por 1 hora sob agitação para bloquear sítios inespecíficos. Após o bloqueio os cortes foram incubados com o anticorpo primário (anti-nitrotirosina, diluição 1:200; Millipore, Billerica, MA, EUA) *overnight*. Após esse período de incubação, as lâminas foram lavadas 3 vezes (de 5 minutos cada) com PBS-tween 0,1% sob agitação e o anticorpo secundário foi incubado por 1 hora a temperatura ambiente. Os núcleos foram corados em azul com Hoeschst 33342 (2,5 mg/mL). Uma última lavagem foi feita seguida da montagem das lâminas com lamínulas e meio de montagem Gel Mount e leitura em microscópio invertido (Leica DMI3000B). As imagens foram adquiridas com uma câmera acoplada ao microscópio, objetiva de 40x (Leica DFC310FX). A intensidade de fluorescência foi quantificada usando o software Image J 1.41 (NIH, USA).

3.3.20. ATIVIDADE DAS ENZIMAS METALOPROTEINASES POR ZIMOGRRAFIA

A aorta torácica de ambos os grupos foi coletada e imediatamente congelada e preservada em nitrogênio líquido (-165 °C). Foram pesadas e homogeneizadas (1/10, p/v) em tampão de extração (100 mM Tris-HCl, pH 7,6, 200 mM NaCl, 100 mM CaCl₂ e 1% Triton X-100) à 4 °C. Após a centrifugação (15000 g), o sobrenadante foi dividido em alíquotas de 100 µl, e a concentração proteica determinada. Para as amostras de sangue, as mesmas foram coletadas da veia cava de cada animal, centrifugadas, e o sobrenadante foi transferido e armazenado a -80 °C até a realização dos experimentos. Quantidades preestabelecidas de proteína total foram utilizadas para zimografia (20 µg/poço).

As zimografias foram executadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE de 5% para entrada e 7% para separação, contendo gelatina (substrato bem

caracterizado da MMP-2 e MMP-9) do tipo A de pele suína (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, CA) na concentração de 2 mg/mL. A eletroforese (em sistema Power Pac 200 – Bio-Rad, EUA) foi realizada a 100 V por um tempo médio de 90 minutos. Após a eletroforese, os géis foram lavados quatro vezes em Triton X-100 a 2,5% para total remoção do SDS seguido de incubação a 37 °C em tampão contendo o substrato (10 mM Tris–HCl, pH 7,5, 5 mM CaCl₂, ZnCl₂ 1 µM) por 20 horas. Os géis foram corados com *coomassie blue* R250 (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, CA) e lavados em solução descorante contendo 50% de metanol, 10% de ácido acético e 40% (q.s.p.) de H₂O. A atividade gelatinolítica foi visualizada por bandas não marcadas em um fundo azul representando áreas de proteólise no substrato de proteína. A análise semi-quantitativa foi feita usando o programa de análise de imagem (Image J, NIH, EUA), e os resultados expressos em unidades arbitrárias em relação ao controle utilizado (*HT-1080 cells*).

3.3.21. ANÁLISES HISTOLÓGICAS

Para avaliação histológica, as aortas torácicas obtidas dos animais controles e pós-sepse (60 dias) foram fixadas em solução ALFAC (85% de álcool 80%, 10% de formol e 5% de ácido acético glacial) e posteriormente desidratadas em álcool e xilol, emblocadas em parafina, seccionadas em cortes de 5 µm com o auxílio de um micrótomo e coradas com hematoxilina e eosina, tricrômico de mallory e picrosirius red. Os cortes foram visualizados e fotografados com o auxílio de uma câmera Olympus DO071 acoplada a um fotomicroscópio Olympus BX40 (Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg, Alemanha) para caracterização das alterações histológicas. A intensidade de superfície de colágeno foi quantificada usando o software Image J 1.41 (NIH, USA).

3.3.22. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média. Para a análise estatística foi utilizado o teste *t* de Student ou a análise de variância (ANOVA) de uma via ou duas vias seguida pelo teste de Bonferroni, quando aplicáveis. Foi considerado estatisticamente significativo um valor de *p* menor que 0,05; 0,01 ou 0,001.

4. RESULTADOS

4.1. PARTE I

4.1.1. CARACTERIZAÇÃO DAS ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES AGUDAS NO MODELO DE SEPSE E DETERMINAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Iniciamos os experimentos com uma curva de mortalidade com o objetivo de estabelecer o grupo a ser utilizado nos experimentos futuros do pós-sepse, além de obter dados importantes de validação e controle do modelo de sepse. A Figura 1 descreve a sobrevivência dos animais expressa em porcentagem até 120 horas após a cirurgia de indução da sepse por CLP, onde o grupo que apresentou cerca de 70% de sobreviventes (1 furo 14G) foi selecionado para o estudo. Importante ressaltar que durante este período de avaliação os animais deste grupo apresentaram sinais característicos do processo séptico como por exemplo piloereção, letargia, perda de peso e secreção de porfirina no nariz e nos olhos.

Para confirmar que os animais deste grupo de 30% de mortalidade apresentavam critérios que os incluíssem num quadro de sepse severa e/ou choque séptico, foram conduzidos alguns protocolos experimentais no tempo de 6 horas após a cirurgia de CLP, com 3 grupos experimentais: *naive* (NV), falso operado (*sham operated*; SO) e CLP (S6h). A Figura 2 mostra os níveis plasmáticos de nitrato e nitrito (NO_x), um indicativo da produção de óxido nítrico (NO). Houve um aumento na produção de NO_x bastante significativo no grupo S6h ($130,7 \pm 24,3 \mu\text{M}$) quando comparado ao controle ($6,1 \pm 3,01 \mu\text{M}$). Outro dado importante que esta figura mostra é a similaridade de valores entre os grupos NV e SO, uma vez que muito se discute em virtude da utilização de animais *naive* ou *sham* como grupo controle nos experimentos. Sendo assim, mostramos com esse dado e com outros obtidos a seguir que não há diferença entre os 2 grupos e que a ligadura e perfuração do ceco *per se* é a responsável por promover o processo séptico.

A figura 3 compara a resposta da contração vascular em anéis de aorta nestes grupos experimentais, onde mais uma vez nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos NV e SO, e uma hipocontratilidade foi observada no grupo S6h, tanto para KCl (Figura 3A), fenilefrina (Figura 3B) e angiotensina II (Figura 3C). O mesmo segue para a figura 4, no qual os experimentos foram conduzidos em líquido nutritivo sem cálcio, onde a perda de contratilidade vascular para a fenilefrina

(Figura 4A) e angiotensina II (Figura 4B) no grupo S6h foi mais uma vez verificada. A Tabela 1 resume os principais achados deste bloco experimental expressos na forma de contração máxima (E_{max}) após a administração dos diferentes vasoconstritores em ambos os grupos experimentais.

A partir dessas evidências passamos a trabalhar somente com o grupo NV como controle (CT) já que este não foi diferente do grupo SO. A escolha do grupo NV como controle nos experimentos do pós-sepse também deve-se ao fato de que os estudos clínicos que avaliam a sobrevida dos pacientes após alta-hospitalar compararem os dados obtidos com a população controle (da mesma faixa etária e comorbidades) que nunca teve sepse, ou seja, essa população não é de pacientes que foram hospitalizados e não diagnosticados como não sépticos.

A Tabela 2 descreve o perfil hematológico, na qual destacamos os achados de leucocitopenia e linfocitopenia no grupo S6h, sendo uma das mais frequentes manifestações da sepse e também utilizadas como critério diagnóstico. Além disso o grupo S6h apresentou também níveis aumentados de hemoglobina e hematócrito, além de granulocitose e níveis reduzidos de plaquetas.

Avaliamos também parâmetros *in vivo* onde a Fig. 5A mostra os valores de pressão arterial média (PAM) de $89,76 \pm 2,1$ e $69,59 \pm 3,5$ mm Hg para os grupos CT e S6h, respectivamente. Além disso, mensuramos também os valores de pressão sistólica e diastólica (Figura 5C e D) com uma redução em ambas no grupo S6h, confirmando então o quadro de hipotensão observado na sepse. A frequência cardíaca também foi obtida com valores de 195 ± 7 e 261 ± 6 batimentos por minuto (BPM) para os grupos CT e S6h, respectivamente, confirmando o quadro de taquicardia comumente descrito na sepse (Figura 5B). E ainda, na Figura 6 mostramos as alterações na PAM frente a administração intravenosa de fenilefrina (3, 10 e 30 nmol/kg) (Figura 6A) e angiotensina II (3, 10 e 30 pmol/kg) (Figura 6B) na qual observamos uma redução na resposta no grupo S6h quando comparado com o CT para ambas as drogas e em todas as doses testadas, confirmando assim os principais achados clínicos característicos da sepse severa.

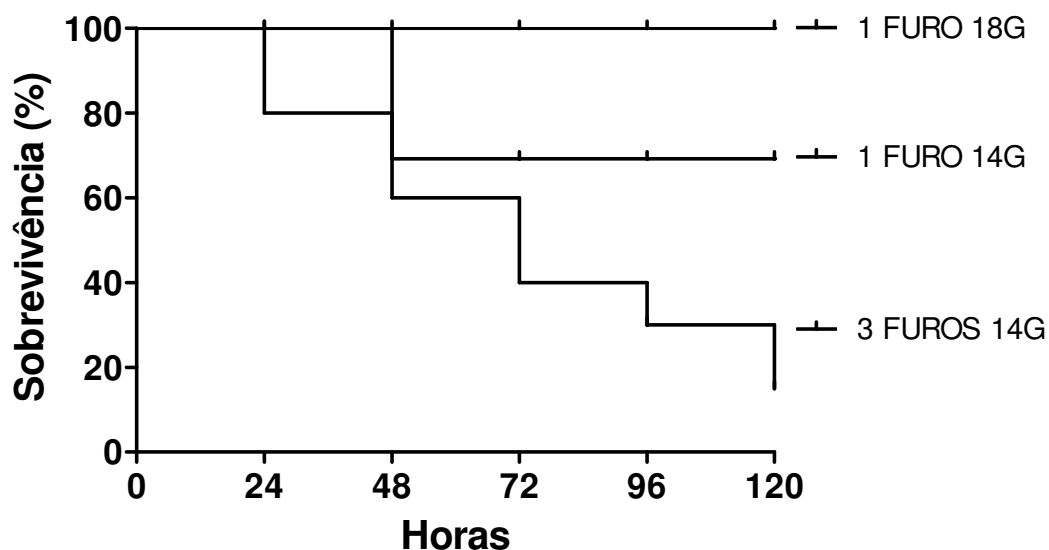


Figura 1. Curva de sobrevivência. Os animais submetidos à cirurgia de indução da sepse por ligadura e perfuração do ceco (CLP) foram monitorados por um período de 120 horas após a cirurgia (n=10-15 por grupo). Resultados expressos em % de sobrevivência. Os 3 grupos experimentais avaliados apresentaram uma significância estatística de $p < 0,01$ quando comparados entre si (teste de Mantel-Cox).

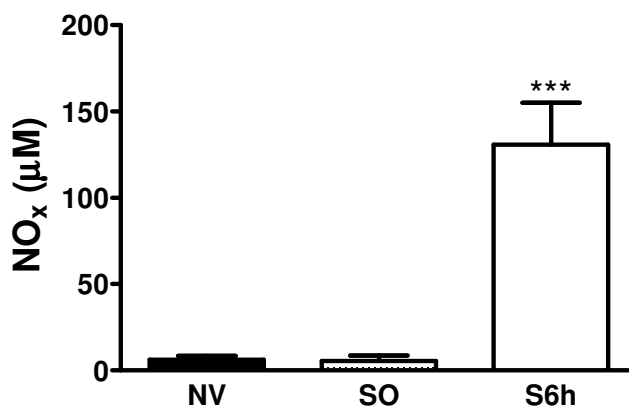


Figura 2. Aumento dos níveis plasmáticos de nitrato e nitrito (NO_x) na sepse. A concentração de NO_x foi determinada no plasma em amostras de sangue de animais dos grupos naive (NV), *sham-operated* (SO) e sépticos (S6h). Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média (n=6). A diferença entre os grupos foi verificada pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Bonferroni. *** $p < 0,001$ quando comparado aos grupos NV e SO.

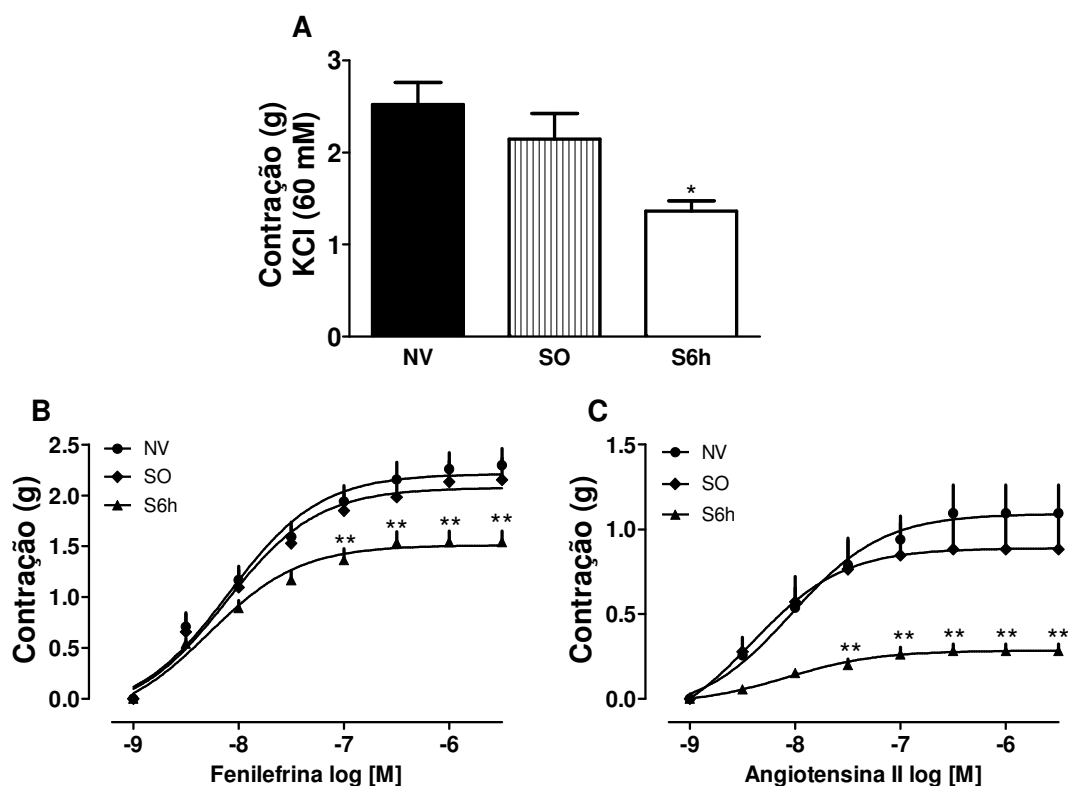


Figura 3. Redução na resposta contrátil a vasoconstritores em aorta isolada de ratos sépticos. A aorta torácica dos grupos naive (NV), *sham-operated* (SO) e sépticos (S6h) foram submetidos ao **A**) KCl 60 mM, **B**) fenilefrina (1 nM – 3 μ M) e **C**) angiotensina II (1 nM – 3 μ M). Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média (n=6). A diferença entre os grupos foi avaliada pela análise de variância (ANOVA), uma (Fig. A) ou duas vias (Fig. B e C), seguida pelo pós-teste de Bonferroni. *p<0,05 quando comparado aos grupos NV e SO. **p<0,01 quando comparado aos grupos NV e SO.

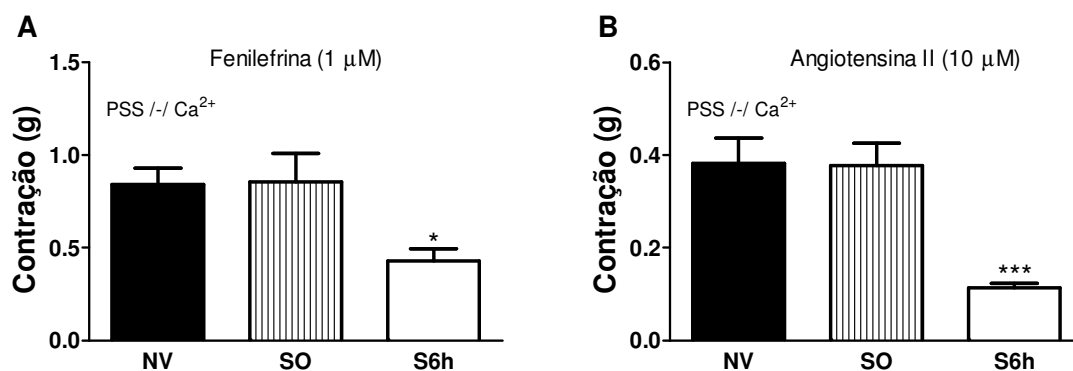


Figura 4. Redução na resposta contrátil a vasoconstritores em anéis de aorta de ratos sépticos mantidos em solução nutritiva sem cálcio. A aorta torácica dos grupos naïve (NV), *sham-operated* (SO) e sépticos (S6h) foram submetidas a contração com **A)** fenilefrina (1 µM) e **B)** angiotensina II (10 µM). Resultados expressos como a média ± erro padrão da média (n=6). A diferença entre os grupos foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo pós-teste de Bonferroni. *p<0,05 quando comparado aos grupos NV e SO; ***p<0,001 quando comparado aos grupos NV e SO.

Tabela 1. Perda de contratilidade vascular a diferentes vasoconstritores durante à sepse.

Emax (g)	NV	SO	S6h
KCl (60 mM; +Ca ²⁺)	2,52 ± 0,24	2,14 ± 0,28	1,36 ± 0,11*
Fenilefrina (3 µM; +Ca ²⁺)	2,29 ± 0,29	2,15 ± 0,27	1,54 ± 0,19**
Fenilefrina (1 µM; -Ca ²⁺)	0,84 ± 0,08	0,85 ± 0,15	0,43 ± 0,06*
Angiotensina II (3 µM; +Ca ²⁺)	1,09 ± 0,16	0,88 ± 0,13	0,28 ± 0,04**
Angiotensina II (10 µM; -Ca ²⁺)	0,38 ± 0,05	0,37 ± 0,04	0,11 ± 0,01***

Resultados expressos como a média da contração máxima obtida (Emax) ± erro padrão da média (n=6). Líquido nutritivo com (+Ca²⁺) e sem (-Ca²⁺) cálcio. A diferença entre os grupos foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo pós-teste de Bonferroni. *p<0,05 quando comparado ao controle (NV e SO); **p<0,01 quando comparado aos grupos NV e SO; ***p<0,001 quando comparado aos grupos NV e SO.

Tabela 2. Alterações hematológicas em ratos durante à sepse.

Hemograma	Controle	S6h
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	$11,13 \pm 1,04$	$7,12 \pm 0,67^*$
Hemoglobina ($10^3/\mu\text{L}$)	$11,94 \pm 0,33$	$16,11 \pm 0,43^*$
Hematócrito (%)	$44,94 \pm 1,37$	$58,73 \pm 0,84^*$
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	$850,60 \pm 28,26$	$715,40 \pm 51,84^*$
Linfócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	$8,32 \pm 0,82$	$3,28 \pm 0,32^*$
Monócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	$1,07 \pm 0,07$	$0,92 \pm 0,06$
Granulócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	$1,72 \pm 0,24$	$2,91 \pm 0,33^*$

Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média (n=6). A diferença entre os grupos foi avaliada pelo teste *t* de Student. * $p < 0,05$ quando comparado ao controle.

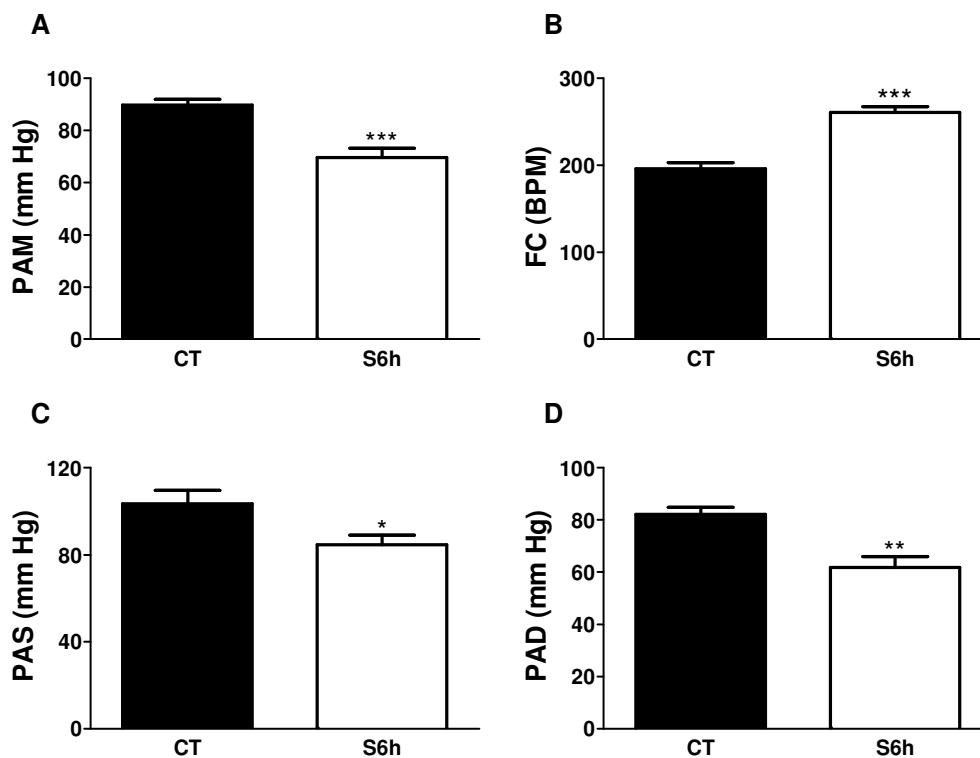


Figura 5. Níveis pressóricos reduzidos e aumento da frequência cardíaca na sepse. A) Pressão arterial média (PAM), **B)** Frequência Cardíaca (FC), **C)** Pressão Arterial Sistólica (PAS) e **D)** Pressão Arterial Diastólica (PAD) dos grupos controle (CT) e sépticos (S6h). Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média (n=5-7). A diferença entre os grupos foi avaliada pela análise de teste *t* de Student. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, quando comparado ao grupo controle (CT).

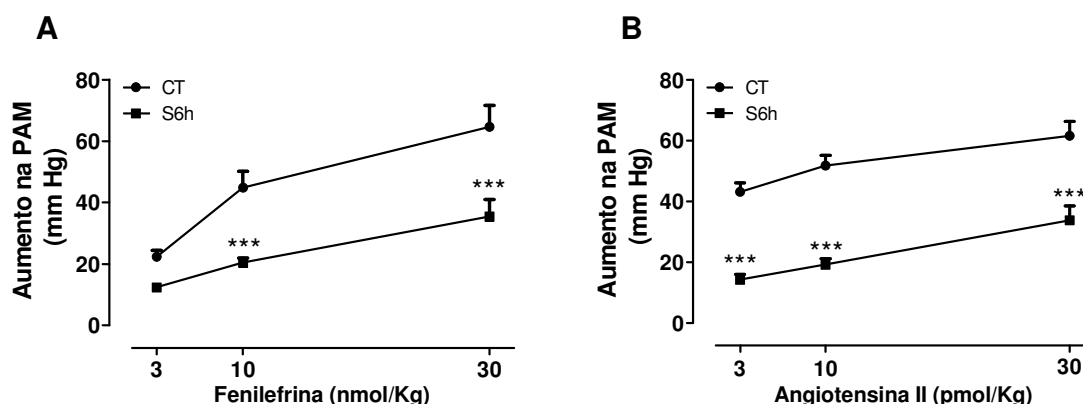


Figura 6. Redução na resposta sistêmica a vasoconstritores na sepse. Alteração na pressão arterial média (PAM) em ratos anestesiados dos grupos controle (CT) e sépticos (S6h), após injeção intravenosa de **A)** fenilefrina (3, 10 e 30 nmol/kg) e **B)** angiotensina II (3, 10 e 30 pmol/kg). Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média ($n=5-7$). A diferença entre os grupos foi verificada pela análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni. *** $p<0,001$ quando comparado ao controle (CT).

4.2. PARTE II

4.2.1. AVALIAÇÃO GERAL DA FUNÇÃO CARDIOVASCULAR EM RATOS SOBREVIVENTES À SEPSE

Com o objetivo de rastrear as possíveis alterações cardiovasculares nos animais sobreviventes a sepse, os experimentos iniciais foram conduzidos em 3 diferentes grupos, mantidos durante 30, 60 e 90 dias após a indução da sepse, denominados grupos S30, S60 e S90 respectivamente, e sempre comparados com seus respectivos controles (CT).

Iniciamos esse bloco experimental com avaliações sistêmicas, como ilustra a Figura 7, a qual mostra a avaliação da função renal *in vivo*, através do ensaio de diurese. O volume de urina excretado foi mensurado por um período de 8 horas e expresso em mL/100 g. Em todos os grupos pós-sepse houve uma redução no volume urinário quando comparado com seus respectivos controles. Outros parâmetros avaliados (Tabela 3) foram o pH e densidade, as quais não apresentaram qualquer diferença entre os grupos. Já em relação à excreção de eletrólitos, apesar de não haver qualquer alteração em relação à excreção de sódio

(Na⁺), cloreto (Cl⁻) e bicarbonato (HCO₃⁻) em nenhum dos grupos pós-sepse, houve um aumento na excreção de potássio (K⁺) nos grupos S60 e S90 (Tabela 3).

A Tabela 3 descreve ainda os níveis plasmáticos de ureia e creatinina nos grupos S30, S60 e S90, que são comumente utilizados como indicadores para avaliar a função renal, onde não observamos diferença significativa entre os grupos.

O próximo passo foi verificar os valores de pressão arterial média (PAM) nos animais anestesiados. Observamos uma redução significativa nos valores pressóricos em todos os grupos pós-sepse, com variações médias em torno de 20-30 mm Hg em relação aos respectivos controles (Figura 8), o que pode contribuir para a redução de volume urinário conforme descrito anteriormente. Além disso, avaliamos as alterações na reatividade vascular nestes mesmos grupos experimentais, através da administração intravenosa de bradicinina (3, 10 e 30 nmol/kg) e angiotensina II (3, 10 e 30 pmol/kg). Observamos um aumento da resposta hipotensora da bradicinina, o principal mediador do sistema cinina-caliceína, nos grupos S30, S60 e S90. Já para os efeitos da angiotensina II, o principal peptídeo efetor do sistema renina-angiotensina, não observamos qualquer alteração de resposta no grupo S30, mas encontramos uma alteração significativa nos grupos S60 e S90, com uma redução na resposta sistêmica hipertensora para a angiotensina II (Tabela 4). Apesar das alterações detectadas no pico das respostas, não existiram alterações significativas no tempo de duração dos efeitos da bradicinina ou da angiotensina II, em nenhum dos grupos pós-sepse avaliados (resultados não mostrados).

Por último, avaliamos alguns parâmetros *ex vivo* como a análise do peso de alguns tecidos e a reatividade vascular da artéria aorta isolada. Apesar da técnica relativamente simples, o peso do tecido muitas vezes pode fornecer indícios importantes em relação ao aparecimento de alterações morfológicas, como por exemplo em casos de hipertrofia. Conforme consta na Tabela 5, que descreve o peso relativo da artéria aorta torácica, rim esquerdo e coração (ventrículos), não houve qualquer alteração significativa entre os grupos avaliados. Da mesma forma, não observamos qualquer diferença significativa entre os grupos quando avaliamos a reatividade da artéria aorta isolada frente a estímulos como KCl, fenilefrina, angiotensina I, acetilcolina e nitroprussiato de sódio (NPS) (Tabela 6).

Com os experimentos apresentados acima, mostramos que existem alterações no sistema cardiovascular e renal que podem vir a desencadear danos

funcionais importantes nestes animais. A partir destes dados passamos a trabalhar com o grupo pós-sepse 60 dias (S60), uma vez que o mesmo apresentou alterações mais significativas que o grupo S30, e semelhantes ao grupo S90.

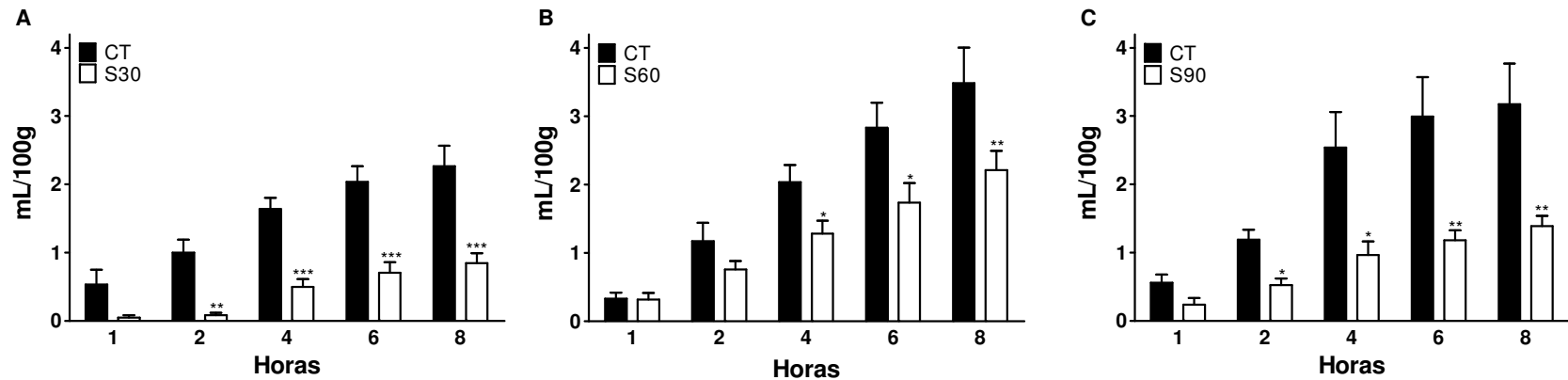


Figura 7. Redução no volume urinário nos animais pós-sepse. A diurese foi mensurada em gaiolas metabólicas por um período de 8 horas nos grupos **A)** S30, **B)** S60 e **C)** S90, com seus respectivos controles (CT). Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média ($n=5$). A diferença entre os grupos foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni. * $p<0,05$, ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$ quando comparado ao controle (CT).

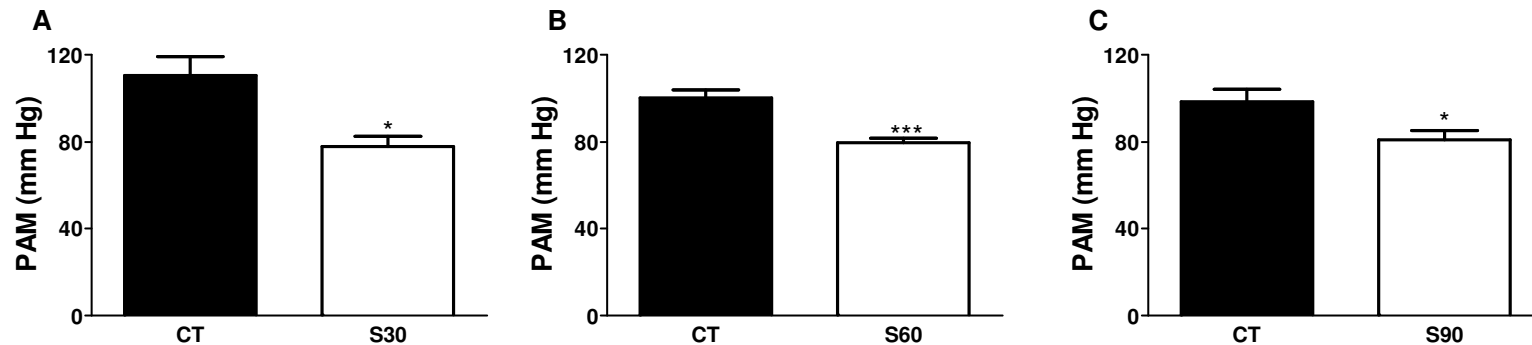


Figura 8. Níveis pressóricos reduzidos no pós-sepse. Os valores de pressão arterial média (PAM) em mm Hg foram obtidos nos animais anestesiados dos grupos **A)** S30, **B)** S60 e **C)** S90, com seus respectivos controles (CT). Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média ($n=6-8$). A diferença entre os grupos foi avaliada pela análise de teste t de Student. * $p<0,05$ e *** $p<0,001$ quando comparado ao controle (CT).

Tabela 3. Avaliação da função renal em ratos sobreviventes à sepse.

	CT	S30	CT	S60	CT	S90
Volume urinário (mL/8 h)	2,26 ± 0,32	0,84 ± 0,43***	3,49 ± 0,56	2,21 ± 0,33**	3,17 ± 0,51	1,38 ± 0,21**
pH	6,46 ± 0,28	6,38 ± 0,14	6,07 ± 0,08	5,91 ± 0,09	6,28 ± 0,12	6,33 ± 0,12
Densidade (g/mL)	0,96 ± 0,01	0,96 ± 0,01	0,98 ± 0,004	0,98 ± 0,007	0,95 ± 0,008	0,97 ± 0,011
Na ⁺ (mmol/L)	25,0 ± 5,04	15,5 ± 1,26	25,4 ± 5,60	35,3 ± 6,18	21,3 ± 5,53	21,6 ± 3,09
K ⁺ (mmol/L)	29,76 ± 6,60	40,32 ± 7,39	35,70 ± 6,88	52,08 ± 2,89*	30,22 ± 4,61	47,52 ± 4,80*
Cl ⁻ (mmol/L)	50 ± 5,77	60 ± 8,16	100 ± 11,55	106 ± 8,96	54 ± 11,18	32 ± 3,26
HCO ₃ ⁻ (mmol/L)	184 ± 16	184 ± 16	220 ± 17	240 ± 12	264 ± 13	244 ± 15
Ureia (mg/dL)	62,89 ± 3,34	72,07 ± 13,68	50,39 ± 3,19	51,79 ± 3,85	85,69 ± 4,58	90,9 ± 8,4
Creatinina (mg/dL)	1,90 ± 0,62	2,37 ± 0,78	1,18 ± 0,17	1,71 ± 0,20	0,98 ± 0,12	1,76 ± 0,54

Resultados expressos como a média ± erro padrão da média (n=5). A diferença entre os grupos foi avaliada pelo teste *t* de Student.
 *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 quando comparado ao controle (CT).

Tabela 4. Responsividade sistêmica a bradicinina e angiotensina II em ratos sobreviventes à sepse.

Redução na PAM (mm Hg)						
Bradicinina (nmol/Kg, i.v.)	CT	S30	CT	S60	CT	S90
3	-31,1 ± 3,1	-32,6 ± 2,9	-17,7 ± 3,5	-20,9 ± 1,0	-20,9 ± 1,1	-37,4 ± 1,3*
10	-41,7 ± 1,3	-45,1 ± 2,7	-34,3 ± 5,2	-41,4 ± 3,7	-31,0 ± 1,7	-42,5 ± 3,2*
30	-49,9 ± 3,6	-62,3 ± 2,8*	-45,6 ± 1,2	-55,3 ± 2,5*	-38,9 ± 3,1	-52,8 ± 4,0*
Aumento na PAM (mm Hg)						
Angiotensina II (pmol/kg, i.v.)	CT	S30	CT	S60	CT	S90
3	37,6 ± 3,2	37,4 ± 3,1	47,6 ± 4,1	34,2 ± 3,1*	37,7 ± 4,8	32,3 ± 4,3
10	43,4 ± 3,3	41,4 ± 1,7	52,5 ± 3,5	41,9 ± 2,4*	43,8 ± 7,3	32,3 ± 4,2
30	51,9 ± 4,4	50,1 ± 2,5	60,7 ± 3,9	47,5 ± 4,1*	56,7 ± 7,5	39,2 ± 3,4*

Resultados expressos como a média ± erro padrão da média (n=6-8). A diferença entre os grupos foi verificada pela análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni. *p<0,05 quando comparado ao controle (CT).

Tabela 5. Peso relativo da aorta torácica, rim e coração obtidos de ratos sobreviventes à sepse.

	CT	S30	CT	S60	CT	S90
Aorta (g)	0,012 ± 0,001	0,012 ± 0,001	0,011 ± 0,001	0,011 ± 0,001	0,010 ± 0,001	0,010 ± 0,001
Rim (g)	0,33 ± 0,011	0,35 ± 0,018	0,33 ± 0,016	0,33 ± 0,008	0,34 ± 0,009	0,33 ± 0,014
Coração (g)	0,26 ± 0,008	0,27 ± 0,007	0,27 ± 0,012	0,27 ± 0,006	0,28 ± 0,007	0,29 ± 0,007

Os valores mostram o peso (g) corrigido para cada 100 g (média ± erro padrão da média; n=5). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (ANOVA seguida de Bonferroni).

Tabela 6. Reatividade vascular em aorta isolada de ratos sobreviventes à sepse.

Emax	CT	S30	CT	S60	CT	S90
KCl 60 mM (g)	1,71 ± 0,09	1,59 ± 0,10	1,80 ± 0,16	1,86 ± 0,25	1,67 ± 0,14	1,77 ± 0,17
Fenilefrina 3 µM (g)	2,37 ± 0,20	2,05 ± 0,16	2,06 ± 0,38	2,79 ± 0,46	2,46 ± 0,27	2,28 ± 0,34
Angiotensina I 3 µM (g)	1,24 ± 0,24	1,21 ± 0,16	1,34 ± 0,21	1,65 ± 0,27	0,78 ± 0,11	0,79 ± 0,13
NPS 10 µM (%)	99,6 ± 0,38	96,11 ± 2,19	98,21 ± 1,78	98,79 ± 0,81	100 ± 0	98,43 ± 1,37
Acetilcolina 10 µM (%)	83,19 ± 3,28	86,99 ± 4,36	90,84 ± 4,78	85,43 ± 3,09	90,54 ± 0,77	94,21 ± 2,09

Resultados expressos como a média do efeito máximo obtido (Emax) ± erro padrão da média (n=6). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (ANOVA seguida de Bonferroni).

4.3. PARTE III

AVALIAÇÕES COMPLEMENTARES NOS ANIMAIS SOBREVIVENTES À SEPSE – GRUPO S60

4.3.1. EVOLUÇÃO NO PÓS-SEPSE

Avaliamos o peso corporal e o consumo alimentar e hídrico semanalmente nos ratos sobreviventes até 60 dias após a sepse. Apesar dos animais apresentarem uma perda de peso nos primeiros dias após a indução da sepse (entre 10 e 15 g), ao final da 1ª semana até o término dos 60 dias avaliados no pós-sepse não encontramos diferença no peso desses animais quando comparado ao grupo controle. De forma semelhante, também em relação ao consumo de ração, somente na primeira semana houve uma redução de consumo no grupo S60 o que provavelmente está relacionado com a debilitação do animal nas primeiras 72 horas após a indução da sepse. Não houve diferença no consumo de água entre os grupos no decorrer do tempo avaliado (Tabela 7).

4.3.2. AVALIAÇÕES HEMATOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS

As dosagens hematológicas realizadas no sangue coletado dos animais do grupo S60 não revelaram alterações significativas para a maioria dos parâmetros como mostra a tabela 8, sendo eles: leucócitos, hemoglobina, hematócrito, plaquetas e monócitos. Entretanto, o grupo S60 apresentou níveis reduzidos de linfócitos e níveis aumentados de granulócitos quando comparado ao CT (Tabela 8), sugerindo que o quadro de linfocitopenia e granulocitose encontrado agudamente (conforme mostrado anteriormente na Tabela 2 no período de avaliação de 6 horas após a indução da sepse) parece persistir cronicamente.

Em relação às dosagens bioquímicas não observamos diferença entre os níveis plasmáticos de glicose (indicativo da função pancreática), ácido úrico (indicativo da função renal), aspartato transaminase e alanina transaminase (indicativo da função hepática) do grupo S60 quando comparado ao grupo controle (Tabela 8).

Continuando com as avaliações bioquímicas e com o intuito de investigar se a hipotensão observada no pós-sepse poderia estar relacionada a um aumento de NO, os níveis plasmáticos de nitrato e nitrito (NO_x) foram determinados, como mostra a Figura 9. Observamos um aumento de NO_x no grupo S60 quando comparado ao grupo CT.

4.3.3. FLUXO RENAL E RIM ISOLADO

Em virtude dos resultados já descritos acima que mostram uma redução na excreção do volume urinário e aumento na excreção de K^+ , investigamos outros parâmetros que poderiam estar relacionados com alguma alteração na função e hemodinâmica renal dos ratos pós-sépticos.

A Figura 10 mostra que não há diferença entre os grupos quando avaliamos o fluxo sanguíneo renal (FSR) pelo sistema laser-doppler, bem como não observamos diferença na pressão de perfusão vascular renal (PPVR) em preparações de rim isolado e perfundido (Figura 11A), as quais também não mostraram diferença na reatividade à fenilefrina (Figura 11B). Por outro lado, observamos uma redução de resposta para a angiotensina II, nas doses de 30 e 100 pmol, e um aumento na resposta da vasopressina, na dose de 10 pmol, no S60 quando comparado às respostas do grupo CT. Esses dados foram similares aqueles encontrados *in vivo* após administração intravenosa desses agentes vasoativos (abordado no próximo tópico). Alterações na reatividade do leito vascular renal podem contribuir, ao menos em parte, para os resultados obtidos na pressão arterial, e reatividade a vasopressores *in vivo*, no grupo S60.

Tabela 7. Avaliação do consumo alimentar e hídrico e evolução do peso corporal no pós-sepse – Grupo S60

	Consumo alimentar (g)		Consumo hídrico (mL)		Peso corporal (g)	
	CT	S60	CT	S60	CT	S60
1ª semana	154,6 ± 3,4	129,9 ± 12,0*	251,7 ± 5,5	242,9 ± 12,0	207 ± 9	210 ± 10
2ª semana	172,6 ± 6,1	175,0 ± 9,0	305,9 ± 10,7	332,5 ± 17,2	260 ± 9	251 ± 13
3ª semana	181,4 ± 5,4	189,3 ± 11,8	299,9 ± 8,9	369,9 ± 23,2	294 ± 8	287 ± 17
4ª semana	188,3 ± 2,9	207,7 ± 14,6	309,9 ± 7,4	350,0 ± 24,6	303 ± 5	310 ± 21
5ª semana	190,3 ± 1,4	208,9 ± 14,3	367,6 ± 2,9	365,9 ± 25,1	335 ± 3	345 ± 23
6ª semana	193,1 ± 1,3	218,6 ± 12,6	361,9 ± 2,5	370,3 ± 21,4	357 ± 3	370 ± 21
7ª semana	201,9 ± 2,1	219,9 ± 14,8	395,9 ± 4,2	362,1 ± 10,7	372 ± 4	396 ± 26
8ª semana	197,2 ± 1,8	227,8 ± 15,5	360,3 ± 3,4	370,1 ± 25,3	388 ± 4	416 ± 28
9ª semana	196,1 ± 3,0	217,1 ± 15,1	369,7 ± 5,3	376,5 ± 26,3	403 ± 4	435 ± 30

Os parâmetros foram avaliados semanalmente após a indução da sepse pela CLP. Resultados expressos como a média ± erro padrão da média (n=5). A diferença entre os grupos foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni. *p<0,05 quando comparado ao CT.

Tabela 8. Parâmetros hematológicos e bioquímicos avaliados nas amostras de sangue no pós-sepse.

	CT	S60
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	$9,43 \pm 0,66$	$8,57 \pm 0,43$
Hemoglobina ($10^3/\mu\text{L}$)	$13,53 \pm 0,21$	$13,35 \pm 0,23$
Hematócrito (%)	$48,57 \pm 0,89$	$49,70 \pm 0,93$
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	$934,20 \pm 45,88$	$1086,88 \pm 60,44$
Linfócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	$7,44 \pm 0,50$	$5,96 \pm 5,08^*$
Monócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	$1,14 \pm 0,12$	$1,10 \pm 0,08$
Granulócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	$0,84 \pm 0,08$	$1,51 \pm 0,09^*$
Glicose (mg/dL)	$101 \pm 4,0$	$112,5 \pm 2,5$
Ácido úrico (mg/dL)	$2,33 \pm 0,13$	$2,24 \pm 0,12$
Aspartato transaminase (U/L)	$176,3 \pm 55,2$	$319 \pm 49,4$
Alanina transaminase (U/L)	$227,4 \pm 25,3$	$228,6 \pm 8,1$

Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média (n=6). A diferença entre os grupos foi verificada pelo teste *t* de Student. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle (CT).

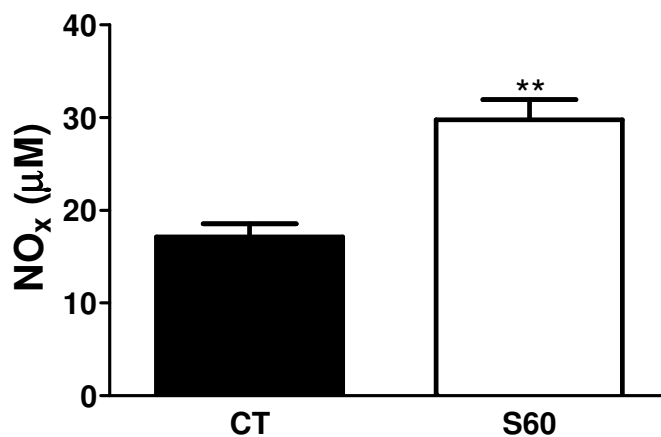


Figura 9. Níveis aumentados de nitrato e nitrito plasmático no pós-sepse. Os níveis de nitrato e nitrito (NO_x) foram determinados nas amostras de sangue coletadas de animais controle (CT) e pós-sepse (S60). Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média (n=10). A diferença entre os grupos foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo pós-teste de Bonferroni. ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo CT.

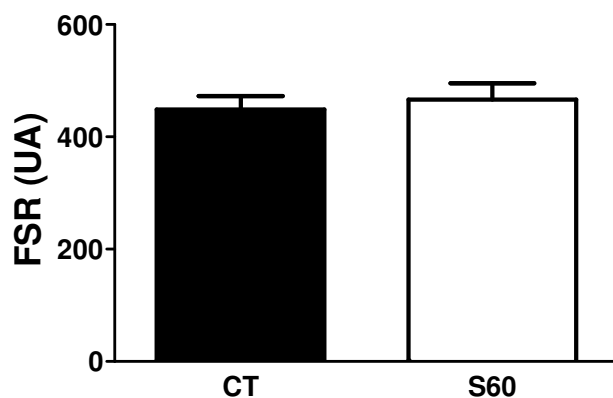


Figura 10. Ausência de alteração no fluxo sanguíneo renal (FSR). O FSR foi determinado nos animais anestesiados dos grupos controle (CT) e pós-sepse (S60) através do sistema laser-doppler. Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média ($n=6-8$). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (teste t de Student).

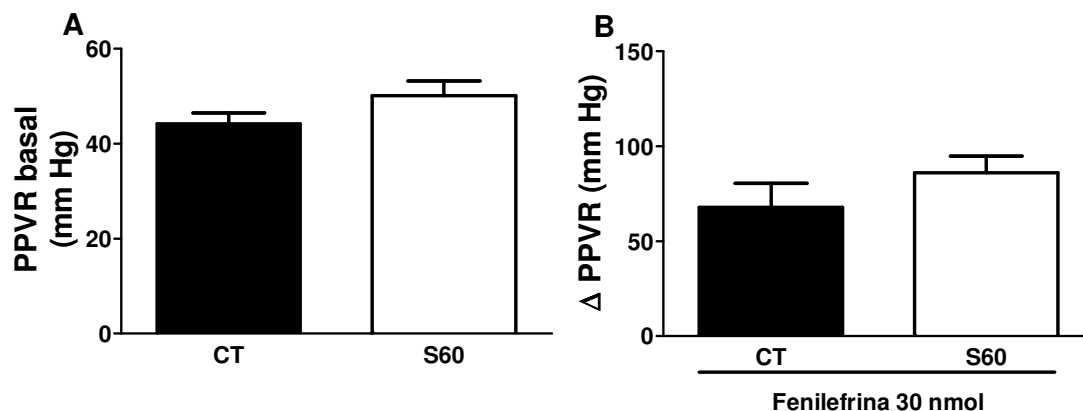


Figura 11. Ausência de alteração na pressão de perfusão vascular renal (PPVR) e na reatividade vascular renal a fenilefrina no pós-sepse. **A)** Os valores de PPVR foram obtidos dos rins isolados dos animais pós-sepse (S60) e em seus respectivos controles (CT). **B)** Variação na PPVR após administração de fenilefrina (30 nmol). Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média ($n=8$). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (teste t de Student).

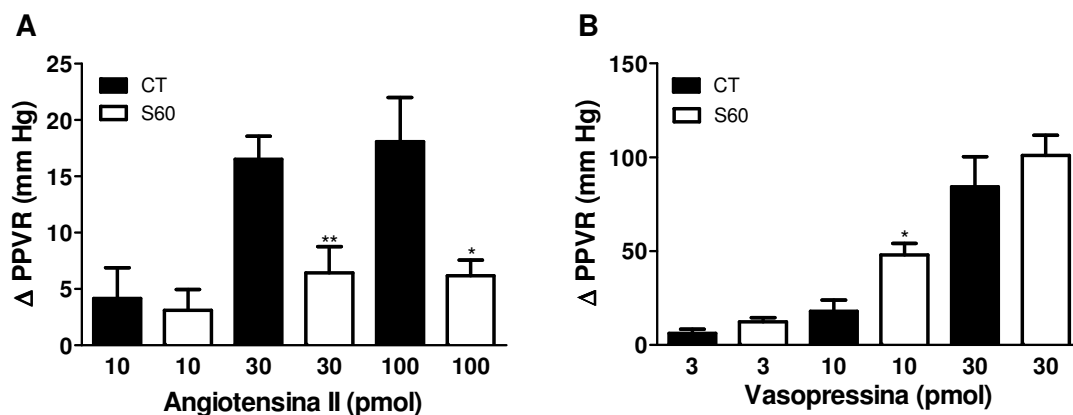


Figura 12. Alterações na reatividade vascular renal no pós-sepse. Os valores de pressão de perfusão foram obtidos dos rins isolados dos animais pós-sepse 60 (S60) dias após a indução, com seus respectivos controles (CT) em resposta a **A)** Angiotensina II e **B)** Vasopressina. Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média (n=8). A diferença entre os grupos foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ quando comparado ao controle (CT). ** $p < 0,01$ quando comparado ao controle (CT).

4.3.4. RESPOSTAS SISTÊMICAS A VASOPRESSORES

Além dos valores de PAM, já mostrados nos experimentos iniciais com todos os grupos de estudo no pós-sepse (Figura 8), os valores de pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) dos animais do grupo S60 também foram avaliados. A Figura 13 mostra uma redução na PAS e na PAD dos ratos S60 quando comparados ao CT, sem alteração na FC, o que nos sugere que a redução na PAM é o resultado tanto de alterações na PAS quanto na PAD.

A Figura 14 mostra o efeito de agentes vasodilatadores, começando pela acetilcolina, que é comumente utilizada por promover uma redução na pressão arterial por mecanismos dependentes de endotélio, como o NO, prostaciclina e fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF). Houve um aumento na resposta à acetilcolina no grupo S60 sem alterações no tempo de duração dos efeitos hipotensores (Figura 14A, B). Por outro lado, não observamos qualquer alteração na amplitude ou duração do efeito do nitroprussiato de sódio, um doador de NO, na PAM dos animais do grupo S60 (Figura 14C, D).

A bradicinina foi outro agente vasopressor que apresentou aumento em seus efeitos sistêmicos na PAM do grupo S60 (Figura 14E, F). A bradicinina atua por 2 tipos de receptores sendo o B_1 chamado de induzido (expresso em situações como, por exemplo, respostas inflamatórias), e o B_2 que é expresso normalmente em

diferentes células, como as do músculo liso vascular, nas quais medeia vasodilatação. O aumento na vasodilatação induzida pela bradicinina nos animais do grupo S60 parece ser dependente apenas do subtipo de receptores B_2 , uma vez que a administração de des-arg9-bradicinina (um agonista seletivo de receptores do subtipo B_1) não foi capaz de alterar a PAM desses animais (dados não mostrados).

Apesar de não observarmos qualquer alteração na resposta à fenilefrina (Figura 15A, B) e à angiotensina I (Figura 15C, D), encontramos um aumento tanto na resposta como na duração do efeito da vasopressina, nas doses de 1 e 3 pmol/kg (Figura 16A, B), nos animais do grupo S60. Essa alteração de resposta para a vasopressina foi explorada em preparações *in vitro*, lembrando que resultados similares foram obtidos quando avaliada a reatividade do rim isolado. Da mesma forma, a alteração de resposta para a angiotensina II (Figura 16 C, D) também foi explorada na sequência.

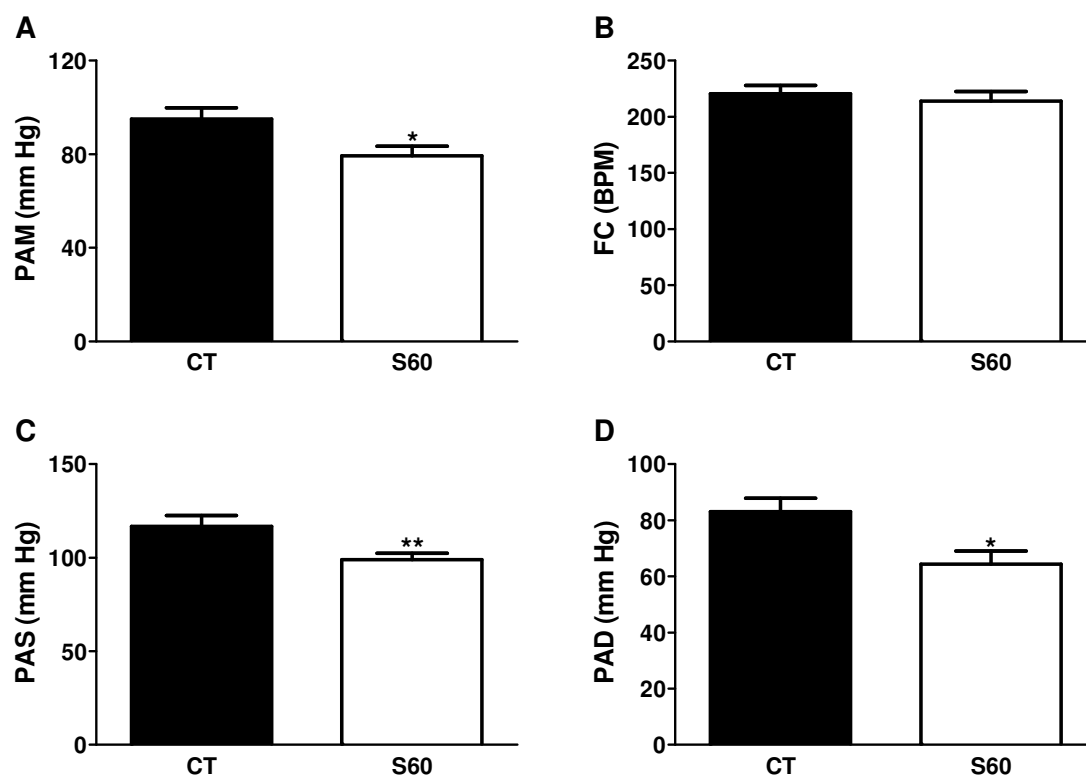


Figura 13. Valores pressóricos e frequência cardíaca no pós-sepse. **A)** Pressão arterial média (PAM) em mm Hg; **B)** Frequência Cardíaca (FC); **C)** Pressão Arterial Sistólica (PAS) e **D)** Pressão Arterial Diastólica (PAD) nos animais pós-sepse S60 e em seus respectivos controles (CT). Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média (n=8). A diferença entre os grupos foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando comparado ao controle (CT).

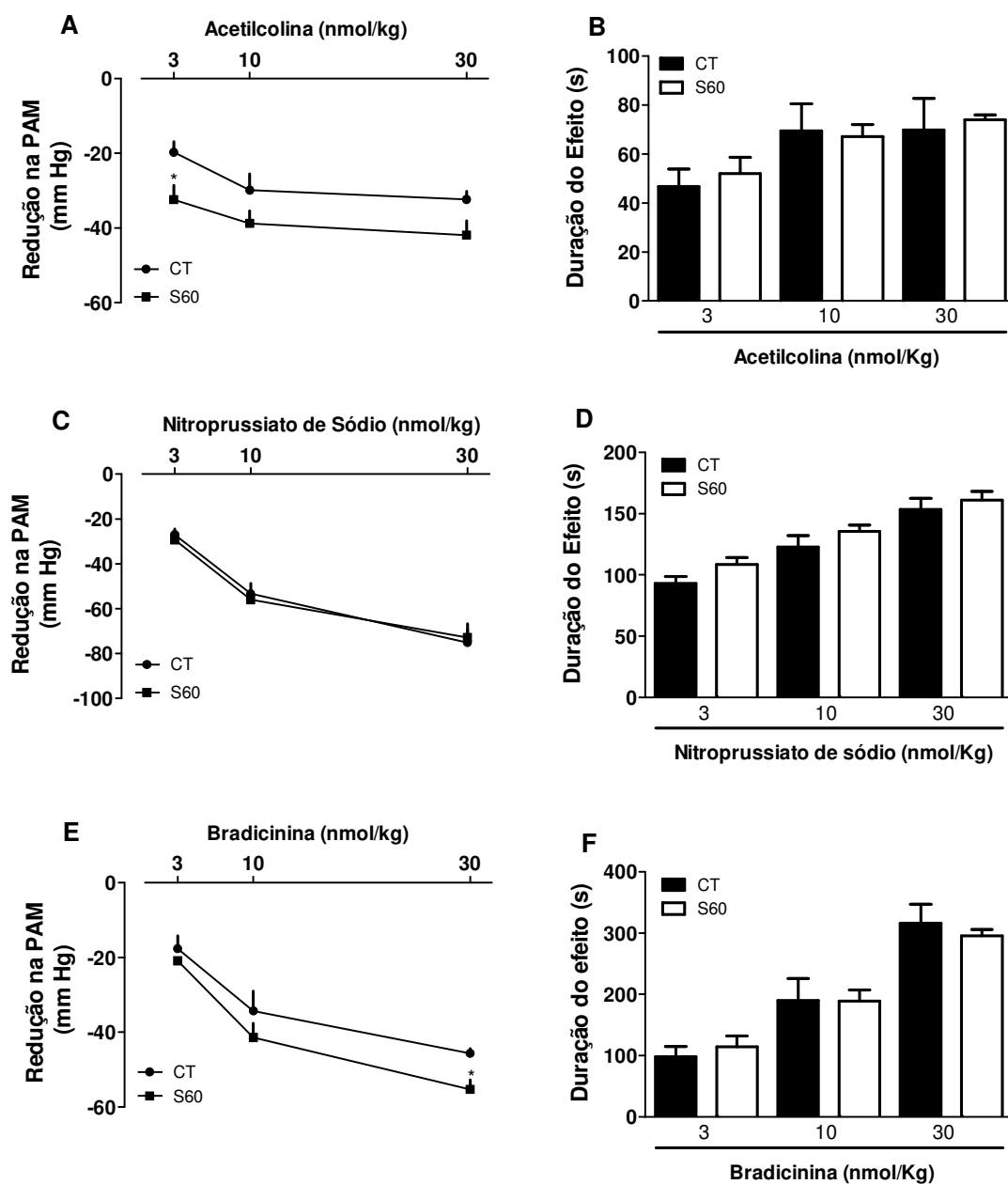


Figura 14. Resposta sistêmica a agentes hipotensores no pós-sepse. Alteração na pressão arterial média (PAM) em resposta à **A)** acetilcolina, **C)** nitroprussiato de sódio e **E)** bradicinina. Duração do efeito da **B)** acetilcolina, **D)** nitroprussiato de sódio e **F)** bradicinina nos animais do grupo pós-sepse S60, e em seus respectivos controles (CT). Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média ($n=5$). A diferença entre os grupos foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni. * $p<0,05$ quando comparado ao controle (CT).

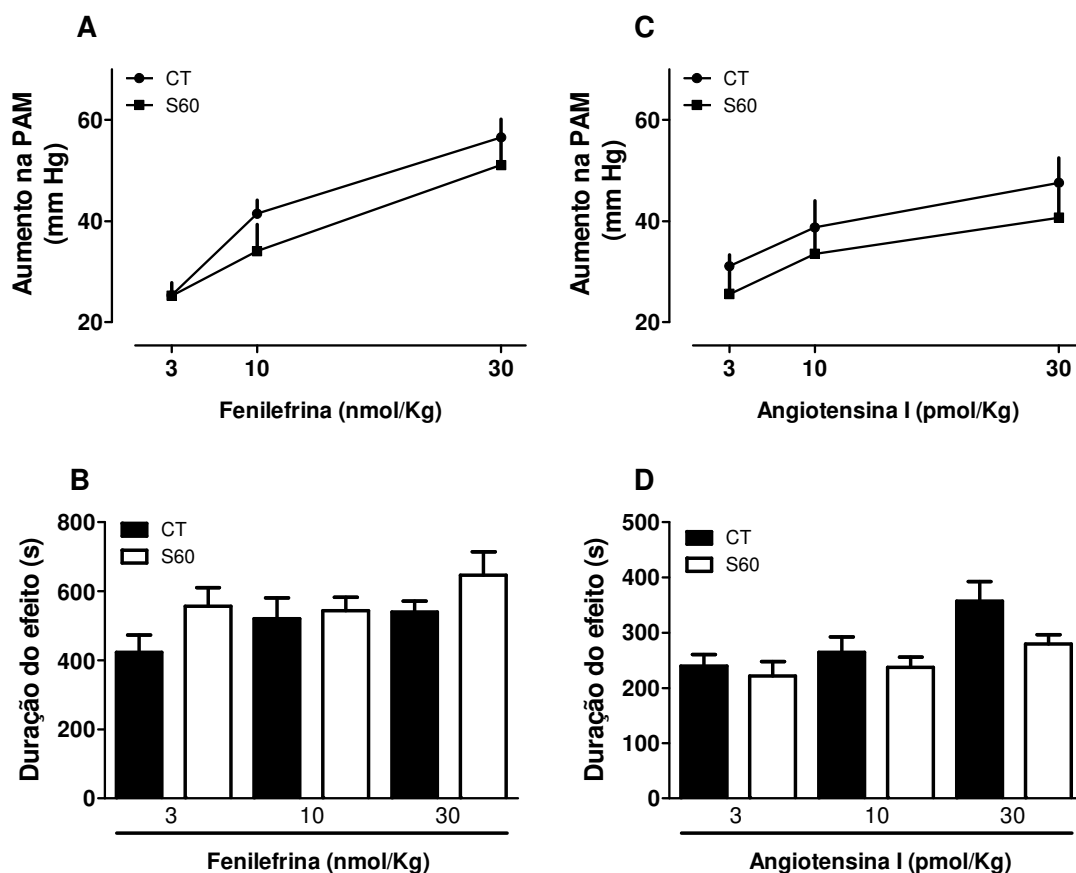


Figura 15. Ausência de alteração na resposta sistêmica à fenilefrina e angiotensina I no pós-sepse. O aumento na pressão arterial média (PAM) e a duração do efeito foram avaliados em animais do grupo S60 e em seus respectivos controles (CT) em resposta à **A)** e **B)** fenilefrina, **C)** e **D)** angiotensina I. Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média (n=5). A diferença entre os grupos foi verificada pela análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni.

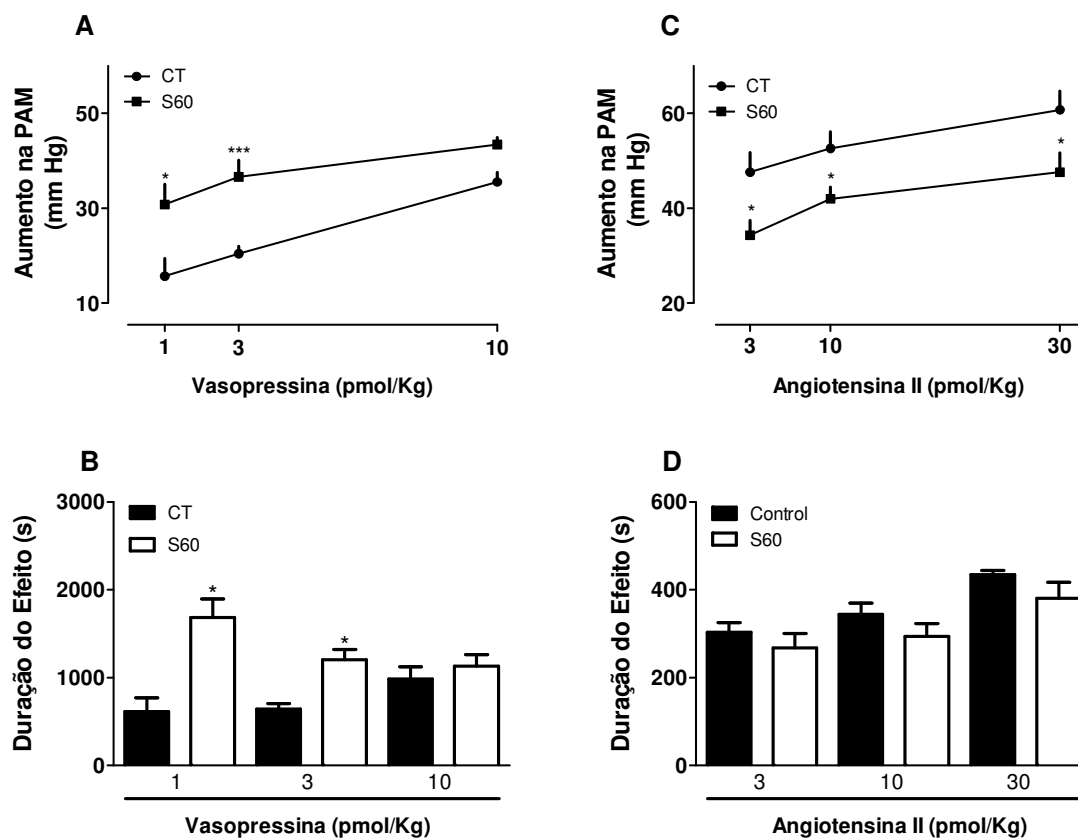


Figura 16. Alteração na resposta sistêmica à vasopressina e angiotensina II no pós-sepse. Alteração na pressão arterial média (PAM) em resposta a **A**) vasopressina e **B**) angiotensina II, e duração do efeito da **C**) vasopressina e **D**) angiotensina II nos animais pós-sepse S60 e em seus respectivos controles (CT). Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média (n=10). A diferença entre os grupos foi verificada pela análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ quando comparado ao controle (CT).

4.4. PARTE IV

4.4.1. INVESTIGAÇÃO DA RESPONSIVIDADE VASCULAR *in vitro*

Com o objetivo de investigar possíveis alterações vasculares e também na tentativa de explorar as vias e os mecanismos intracelulares envolvidos, avaliamos a reatividade vascular em anéis de aorta obtidos dos animais do grupo pós-sepse S60.

A Figura 17 mostra a reatividade vascular das preparações de aorta (na presença de endotélio) obtidas dos ratos CT e S60, na qual observamos um aumento na contração induzida pela administração de concentrações cumulativas

de vasopressina (Figura 17A) e de angiotensina II (Figura 17B). O mesmo aumento de contratilidade foi observado tanto para a vasopressina (Figura 18A) como para a angiotensina II (Figura 18B) quando os efeitos destes vasoconstritores foram avaliados em líquido nutritivo sem cálcio, ou seja, condição na qual a contração é dependente da liberação de Ca^{2+} de reservas intracelulares em especial do retículo sarcoplasmático (RS). Utilizamos também a cafeína, que estimula diretamente os receptores de rianodina, a qual também gerou respostas contráteis no grupo S60, quando comparado ao CT (dados não mostrados). Entretanto, não observamos diferença entre as contrações induzidas pelo cloreto de cálcio (CaCl_2), quando avaliado a resposta do vaso obtido do grupo S60 comparado ao CT, em líquido nutritivo despolarizante sem cálcio (dados não mostrados).

O movimento do Ca^{2+} através da membrana sarcoplasmática se dá através da SERCA, que é uma Ca^{2+} ATPase que transfere Ca^{2+} do citosol da célula para o lúmen do RS. Para investigar se alterações na funcionalidade da SERCA poderiam contribuir para estas alterações, avaliamos a resposta contrátil na presença de tapsigargina, um inibidor da SERCA. A inibição da SERCA pela tapsigargina (1 μM) foi capaz de prevenir completamente a hiper-contratilidade em resposta à vasopressina e angiotensina II em preparações obtidas do grupo S60 sem alterar significativamente os efeitos desses vasoconstritores em preparações obtidas de animais CT (Figura 19).

Com o objetivo de verificar se o aumento da contração aórtica em resposta à vasopressina e angiotensina II no pós-sepse está relacionado com alterações na expressão de receptores seletivos para estes vasoconstritores, avaliamos o efeito destas drogas na presença dos antagonistas DTM-AVP e losartan. A Figura 20 mostra a contração em aorta obtida após administração de concentrações cumulativas de vasopressina na presença e ausência do DTM-AVP (1 nM), um antagonista de receptor V_{1a} , na qual pode-se observar que o DTM-AVP foi eficiente em impedir os efeitos constritores da vasopressina com perfil similar entre os grupos. Analisamos também a expressão dos receptores pelos quais a vasopressina interage na vasculatura, conforme representado na Figura 21. Não observamos alteração na expressão dos receptores V_{1a} (responsáveis pelos efeitos vasoconstritores) e V_2 (relacionados com efeitos vasodilatadores) da vasopressina detectados nos homogenatos aórticos obtidos dos ratos do grupo pós-sepse S60 e CT através de metodologia de WB. Estes resultados sugerem que o aumento da

resposta evocada pela administração de vasopressina não envolve alterações na expressão desses receptores.

A Figura 22 mostra o efeito contrátil da angiotensina II em aortas na presença ou ausência do losartan (1 μ M), um antagonista seletivo de receptor AT_1 , na qual observamos que o efeito do antagonista foi semelhante nos dois grupos. A angiotensina II promove seus efeitos fisiológicos pela ativação de receptores do subtipo AT_1 (vasoconstrição), enquanto poucos efeitos, geralmente opostos àqueles desencadeados pela ativação deste receptor, têm sido atribuídos à ativação de receptores AT_2 (expressos no endotélio vascular e aparentemente com pouca relevância biológica neste tipo de vaso). Por isso, avaliamos também através da metodologia de WB, a expressão do receptor AT_1 em homogenatos aórticos, a qual não revelou diferença entre os grupos (Figura 23). Este resultado sugere que o aumento da contração induzido pela angiotensina II parece ser mediado por alterações na sinalização intracelular por ela estimulada e não por alterações na expressão de seus receptores. A expressão dos receptores AT_2 foi pouco detectada nos homogenatos aórticos obtidos do grupo S60 e não foi diferente quando comparado ao CT (dados não mostrados).

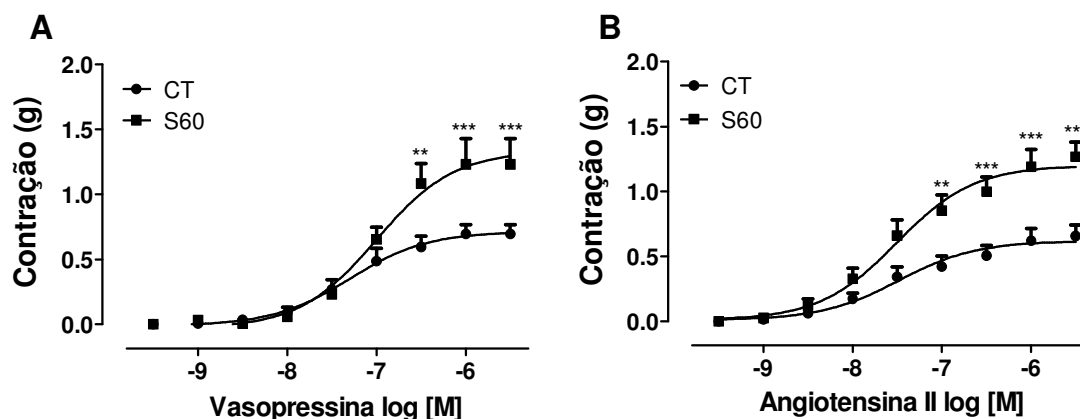


Figura 17. Aumento na reatividade vascular à vasopressina e angiotensina II no pós-sepse. Contração de anéis de aorta obtidos dos animais pós-sepse S60 e seus respectivos controles (CT) em resposta à **A)** vasopressina e **B)** angiotensina II. Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média (n=8). A diferença entre os grupos foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni. **p<0,01 e ***p<0,001 quando comparado ao controle (CT).

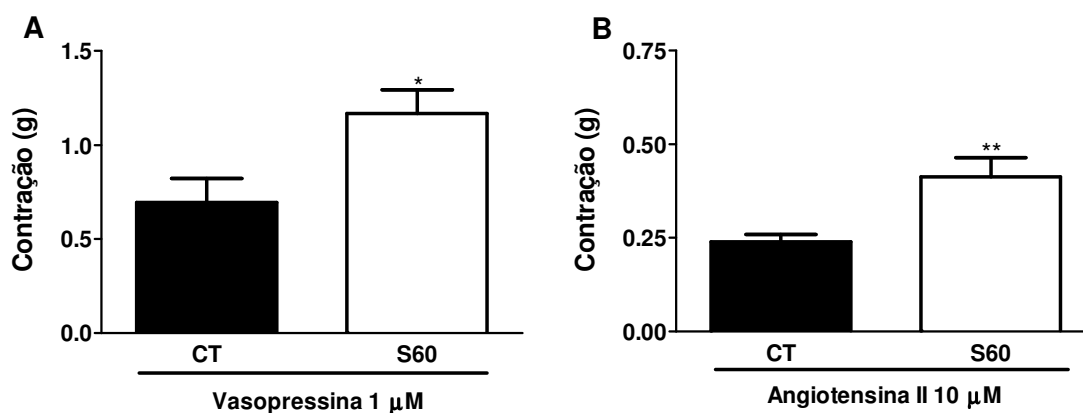


Figura 18. Aumento na reatividade vascular no pós-sepse em meio livre de cálcio. Contração em anéis de aorta obtidos dos animais pós-sepse S60 e seus respectivos controles (CT) em resposta a **A)** vasopressina e **B)** angiotensina II em líquido nutritivo sem cálcio. Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média (n=8). A diferença entre os grupos foi verificada teste *t* de Student. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando comparado ao controle (CT).

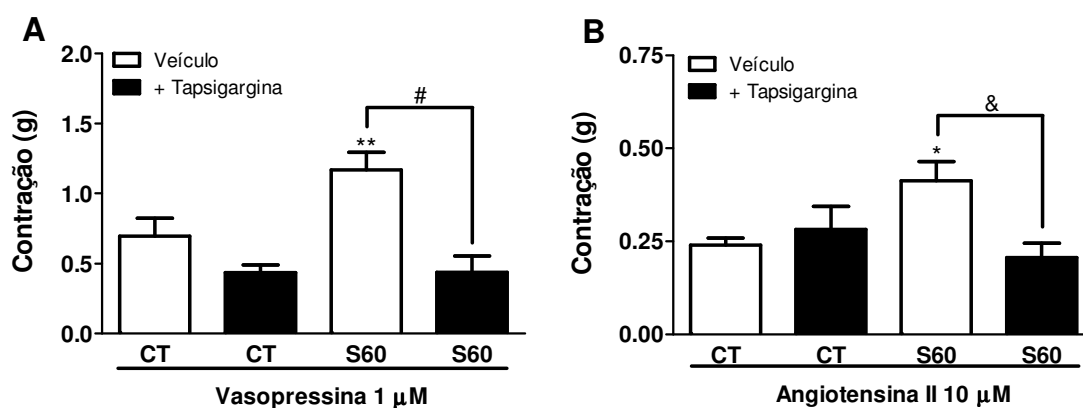


Figura 19. Reversão da hiper-contratilidade vascular à vasopressina e angiotensina II pela tamsulosina no pós-sepse. Contração em anéis de aorta obtidos dos animais pós-sepse S60 e seus respectivos controles (CT) em resposta à **A)** vasopressina e **B)** angiotensina II, em líquido nutritivo sem cálcio, na ausência ou presença da tamsulosina (1 μ M). Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média (n=5). A diferença entre os grupos foi verificada pela análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste *t* de Bonferroni. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando comparado ao CT; # $p < 0,001$ quando comparado S60 x S60; & $p < 0,05$ quando comparado S60 x S60.

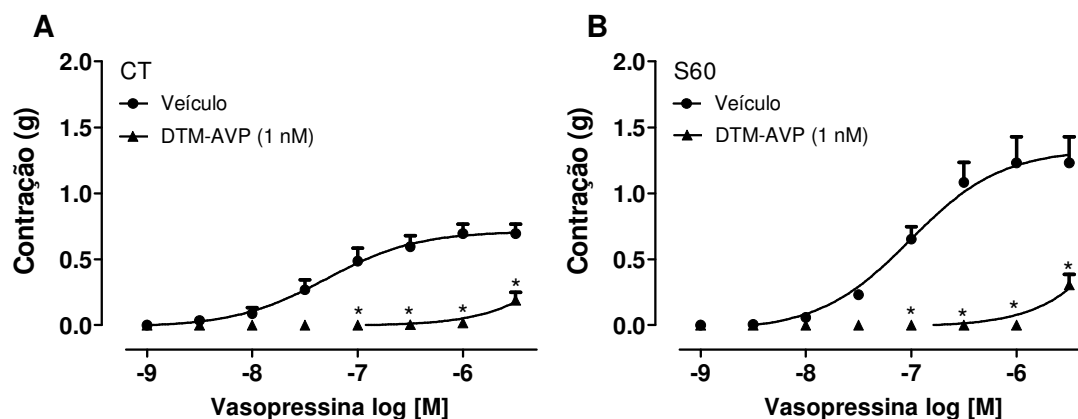


Figura 20. Contração vascular induzida pela vasopressina na presença do antagonista de receptor V1a o DTM-AVP. Contração em anéis de aorta obtidos dos animais **A)** controles (CT) e **B)** pós-sepse S60 em resposta a vasopressina na ausência ou presença do DTM-AVP (1 nM). Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média (n=8). A diferença entre os grupos foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,01$ quando comparado ao veículo.

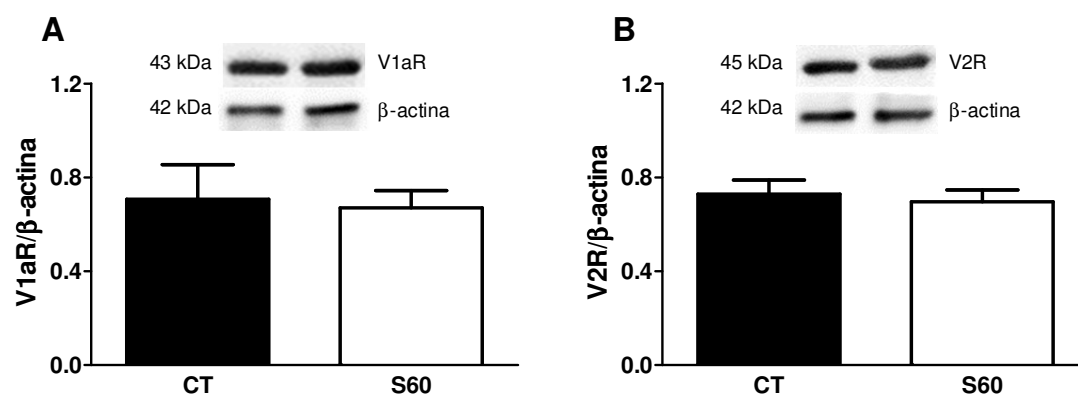


Figura 21. Imagens representativas obtidas por WB e análises densitométricas das proteínas V1aR e V2R no pós-sepse. Os homogenatos aórticos foram obtidos dos animais controles (CT) e pós-sepse S60. **A)** Expressão de V1aR e **B)** expressão de V2R em relação a β -actina. Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média (n=4-5). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (teste *t* de Student).

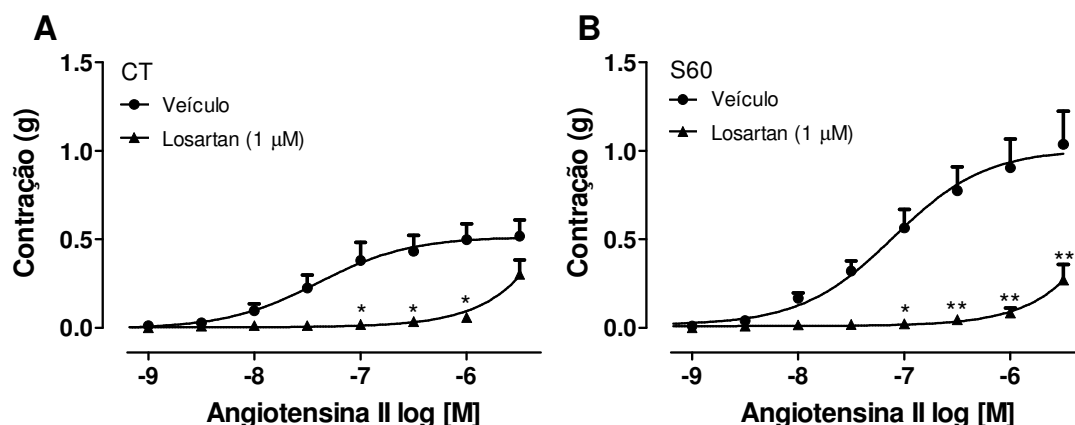


Figura 22. Contração vascular induzida pela angiotensina II na presença do losartan. Contração em anéis de aorta obtidos dos animais **A)** controles (CT) e **B)** pós-sepse 60 (S60) dias em resposta a angiotensina II na ausência ou presença do losartan. Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média. A diferença entre os grupos foi verificada pela análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,01$ quando comparado ao controle (CT). ** $p < 0,001$ quando comparado ao controle (CT).

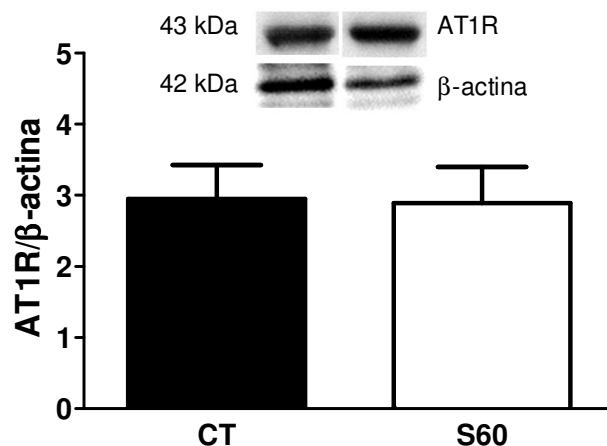


Figura 23. Imagens representativas obtidas por WB e análises densitométricas da proteína AT1R no pós-sepse. Os homogenatos aórticos foram obtidos dos animais controles (CT) e pós-sepse S60. Expressão de AT₁R em relação à β -actina. Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média ($n=4-5$). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (teste t de Student).

4.4.2. O PAPEL DO ENDOTÉLIO NA HIPER-CONTRATILIDADE VASCULAR NO PÓS-SEPSE

O próximo passo do nosso estudo consistiu em investigar o papel do endotélio nas alterações da reatividade vascular observadas no pós-sepse. Conforme apresentaremos a seguir, nosso intuito foi investigar o envolvimento de agentes pró-oxidantes e a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) nestas alterações. Nesta sequência de experimentos passamos a utilizar somente a angiotensina II.

Para isto, primeiramente investigamos a existência de diferenças na resposta contrátil à angiotensina II em preparações com e sem endotélio funcional. Observamos um aumento bastante significativo na reatividade para a angiotensina II, na presença de endotélio, em aortas obtidas do grupo pós-sepse S60 (Figura 24B). Entretanto, a remoção do endotélio não foi capaz de alterar a resposta contrátil da angiotensina II em aorta do grupo pós-sepse S60 quando comparado ao controle (Figura 24A). Além disso, a Figura 24C mostra a contração da angiotensina II em ambos os grupos na presença de L-NAME (100 μ M), um inibidor da enzima óxido nítrico sintase (NOS), uma vez que já está bem estabelecido que o relaxamento dependente de endotélio nas grandes artérias pode ser completamente atribuído ao NO. O L-NAME (cuja concentração utilizada foi o suficiente para impedir completamente o relaxamento induzido pela acetilcolina), assim como a remoção do endotélio, foi capaz de aumentar a reatividade à angiotensina II no grupo CT mas não aumentou a resposta no grupo pós-sepse S60, sugerindo o envolvimento do NO nestas alterações.

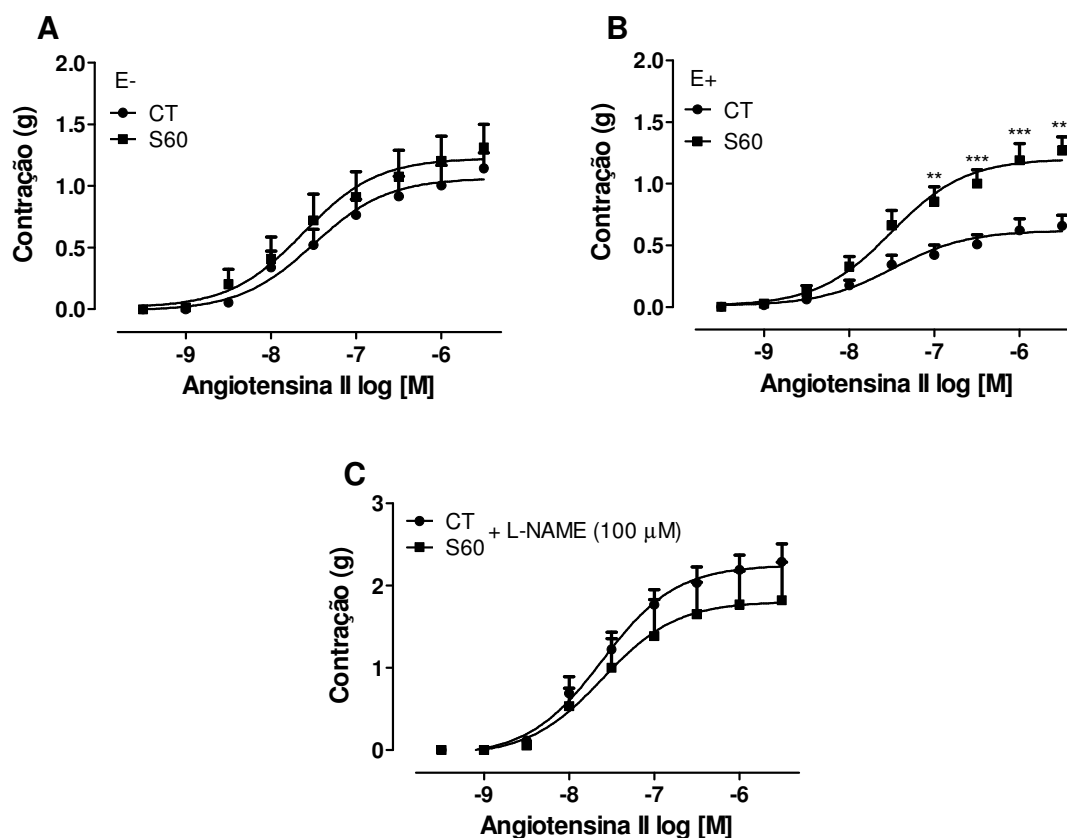


Figura 24. Aumento da contração vascular induzida pela angiotensina II na presença de endotélio no pós-sepse. Contração em anéis de aorta obtidos dos animais pós-sepse S60 e seus respectivos controles (CT) em resposta à angiotensina II **A**) sem endotélio, **B**) com endotélio e **C**) na presença de L-NAME (100 μM). Resultados expressos como a média ± erro padrão da média. A diferença entre os grupos foi verificada pela análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni. ** $p < 0,01$ quando comparado ao controle (CT). *** $p < 0,001$ quando comparado ao controle (CT).

O NO é frequentemente associado ao processo de estresse oxidativo principalmente devido a sua inativação pelo ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (CAI e HARRISON, 2000). O complexo enzimático NADH/NADPH oxidase o qual está associado à membrana parece ser a principal fonte de espécies reativas de oxigênio (EROs) na vasculatura (LASSEGUE & CLEMPUS, 2003), sendo que sua expressão e atividade são aumentadas em resposta a uma variedade de estímulos incluindo a angiotensina II (MOLLNAU *et al.*, 2002). A ligação da angiotensina II aos receptores AT1 ativa a enzima pró-oxidante β-nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase no endotélio vascular e células do músculo liso, aumentando a

produção de EROs, tais como o ânion superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

Sendo assim, avaliamos os níveis de hidroperóxidos lipídicos (LOOH), um indicativo da produção de EROs, nos homogenatos aórticos obtidos dos animais controle e pós-sepse do grupo S60, além da maquinaria endógena celular antioxidante. A Figura 25A mostra níveis aumentados de LOOH no pós-sepse, associado a um aumento de glutathiona (GSH; Figura 25B), um potente antioxidante que reage rapidamente e de forma não-enzimática na desativação de radicais. Níveis celulares reduzidos de GSH são algumas vezes encontrados em condições severas de estresse oxidativo (CNUBBEN *et al.*, 2001). Entretanto, níveis aumentados de GSH podem indicar um desequilíbrio em outros sistemas antioxidantes.

Por isso avaliamos também a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), responsável por degradar o ânion superóxido em oxigênio e H_2O_2 , catalase (CAT), que metaboliza o H_2O_2 em água e oxigênio, e a glutathiona-S-transferase (GST), capaz de detoxificar compostos endógenos. Apesar de não observarmos qualquer diferença na atividade da CAT e GST (Figura 27) entre os grupos CT e pós-sepse S60, observamos uma redução bastante significativa na atividade da SOD no grupo S60 (Figura 26), o que pode indicar um comprometimento na dismutação do ânion superóxido, contribuindo assim para a geração de EROs na vasculatura dos animais do grupo pós-sepse.

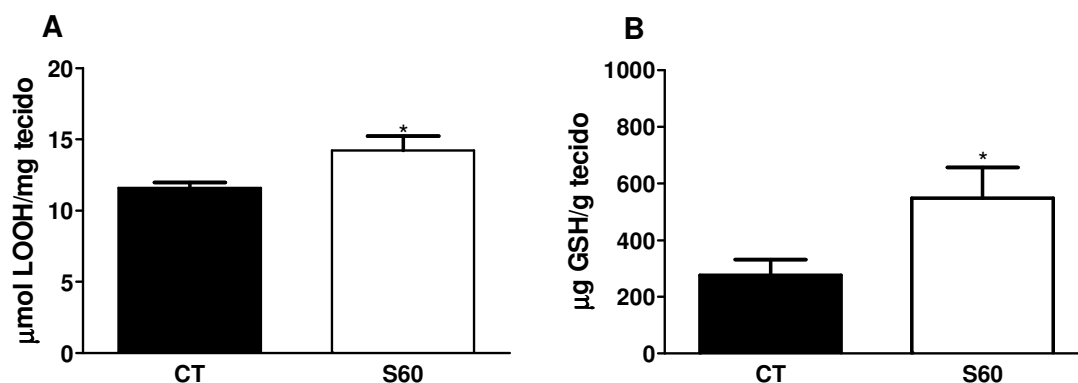


Figura 25. Aumento dos níveis de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) e glutathiona (GSH) em aorta no pós-sepse. Aumento nos níveis de **A)** LOOH e **B)** GSH nos homogenatos aórticos obtidos dos ratos pós-sepse S60 e em seus respectivos controles (CT). Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média (n=10). A diferença entre os grupos foi avaliada pelo teste *t* de Student. * $p < 0,05$ quando comparado ao controle (CT).

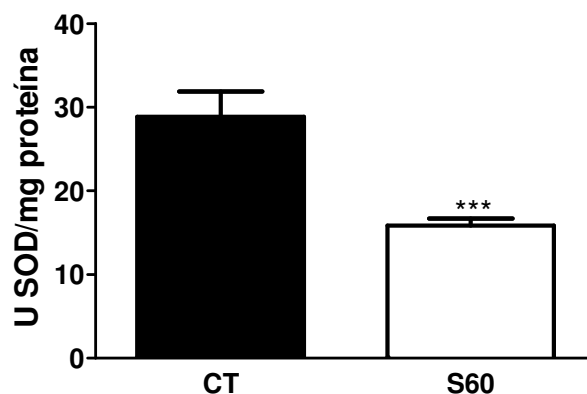


Figura 26. Redução na atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em aorta no pós-sepse. Atividade da SOD detectada nos homogenatos aórticos obtidos dos ratos pós-sepse S60 e em seus respectivos controles (CT). Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média (n=10). A diferença entre os grupos foi verificada pelo teste *t* de Student. *** $p < 0,001$ quando comparado ao controle (CT).

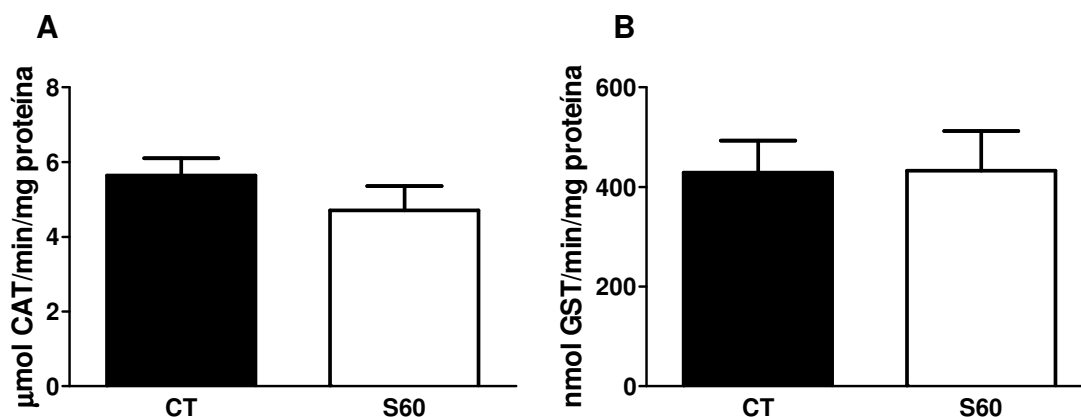


Figura 27. Ausência de alteração na atividade das enzimas catalase (CAT) e glutathiona-S-transferase (GST) em aorta no pós-sepse. A) Atividade enzimática da CAT e B) GST nos homogenatos aórticos obtidos dos ratos pós-sepse S60 e em seus respectivos controles (CT). Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média (n=10). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (teste *t* de Student).

O próximo passo foi verificar se estas alterações nos níveis e atividade dos antioxidantes endógenos contribuem para à resposta contrátil aumentada em aorta à angiotensina II, onde hipotetizamos que restaurando o equilíbrio entre a produção de EROs e o sistema antioxidante essa hiper-contratilidade poderia ser prevenida. Primeiramente adicionamos apocinina (inibidor de NADPH; 1 mM) nas preparações de aorta com o intuito de reduzir a liberação de EROs após o estímulo com angiotensina II, e observamos que essa concentração de apocinina não alterou a resposta contrátil no grupo CT (Figura 28A), mas impediu a hiper-contratilidade no grupo pós-sepse S60 (Figura 28B). Quando a SOD (300 U/mL) foi adicionada as preparações o mesmo efeito foi observado, alterando apenas a resposta contrátil das aortas obtidas dos animais do grupo pós-sepse S60 (Figura 28C, D). Da mesma forma, a incubação de tempol (0,3 mM; sequestrador de ânion superóxido) não alterou a contração dos anéis de aorta do grupo CT (Figura 28E), mas evitou a hiper-contratilidade no grupo pós-sepse S60 (Figura 28F).

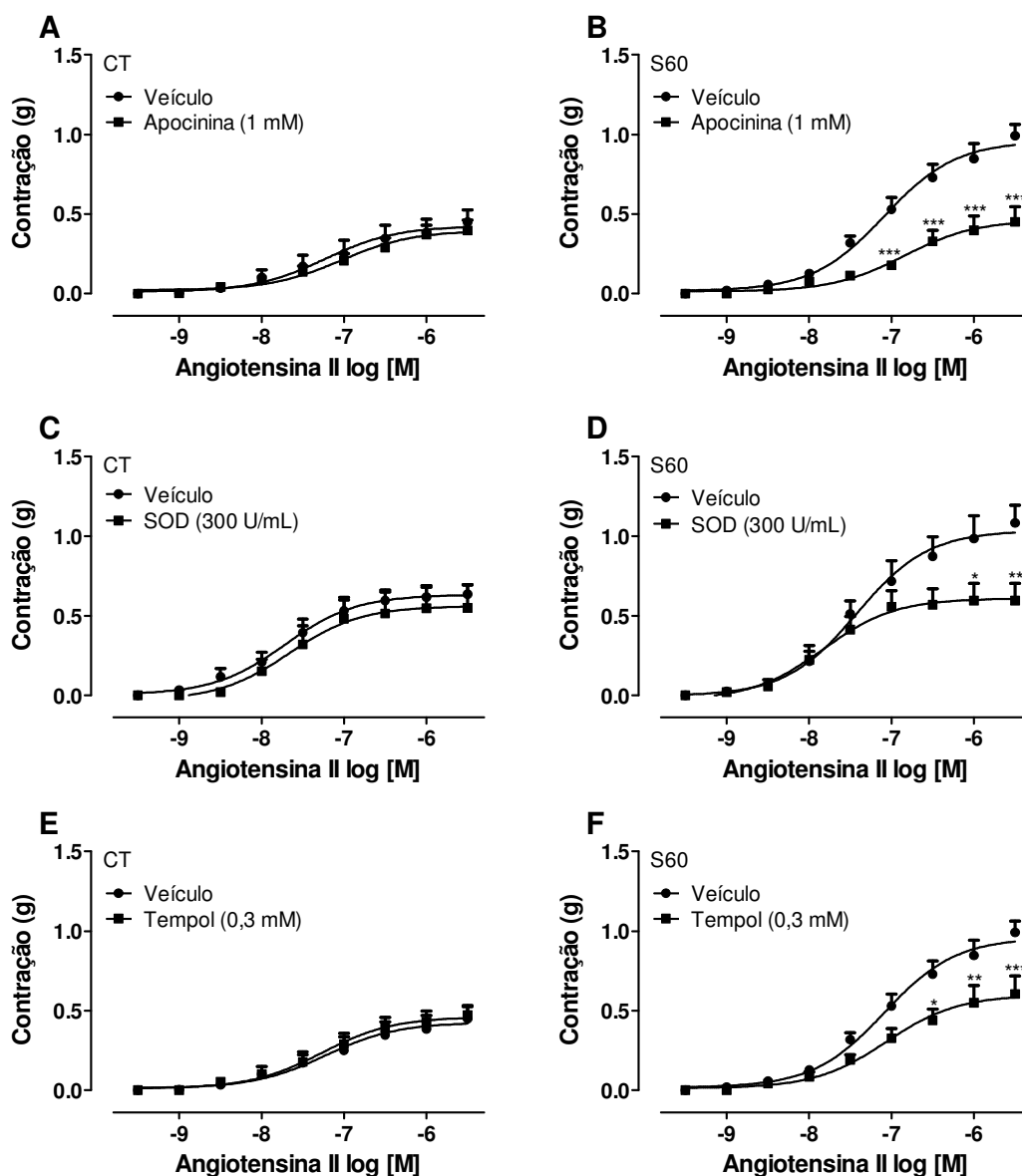


Figura 28. Redução na produção ou disponibilidade de O_2^- previne a hipercontratibilidade em aorta para angiotensina II no pós-sepse. Contração induzida pela angiotensina II após incubação com **A,B**) apocinina, **C,D**) superóxido dismutase (SOD), e **E,F**) tempol nos anéis de aorta obtidos dos ratos pós-sepse S60 e em seus respectivos controles (CT). Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média (n=5). A diferença entre os grupos foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparado ao CT.

Para confirmar esses achados fomos avaliar os níveis de EROs em cortes aórticos obtidos dos animais pós-sepse S60 e em seus respectivos CT através da marcação com sonda fluorescente DHI. Observamos que as aortas obtidas dos animais do grupo pós-sepse S60 apresentam níveis reduzidos de EROs quando comparado com o grupo CT (Figura 29). Entretanto, quando avaliamos a produção de EROs após estimulação com angiotensina II (40 nM) observamos que nas aortas do grupo CT, onde o sistema antioxidante está funcionando corretamente, não há aumento significativo na produção de EROs, ao contrário do que acontece com as aortas obtidas dos animais do grupo pós-sepse S60, onde um aumento bastante significativo foi detectado (Figura 29), o que nos sugere que a redução na atividade da SOD detectada nos homogenatos aórticos do grupo S60 parece influenciar essa elevação nos níveis de EROs, especialmente o ânion superóxido.

Devido a essa redução nos níveis basais de EROs no grupo pós-sepse S60 investigamos se outros agentes poderiam estar sendo formados, já que o ânion superóxido pode gerar peroxinitrito quando não dismutado, através da sua associação com o NO. Por isso, nosso próximo experimento foi avaliar por imunofluorescência os níveis de peroxinitrito nos cortes de aorta, através da marcação com anticorpo anti-nitrotirosina. Observamos um aumento na intensidade de fluorescência nos cortes aórticos obtidos dos animais do grupo pós-sepse S60 quando comparado ao grupo CT, sugerindo assim uma maior formação de peroxinitrito (Figura 30).

Avaliamos também as características histológicas e morfológicas da aorta obtida dos ratos dos grupos CT e pós-sepse S60. Os cortes aórticos foram corados com hematoxilina e eosina e não observamos diferença entre os grupos quando a espessura da camada média foi avaliada (Figura 31), sugerindo que as alterações vasculares no pós-sepse não envolvem modificações nos parâmetros estruturais.

A figura 31 (C, D) mostra a ausência de diferença entre os cortes aórticos obtidos dos ratos dos grupos CT e pós-sepse S60 corados com tricrômico de mallory, o qual permite a visualização das fibras colágenas, conferindo a coloração azul a todas estas fibras, porém não permitindo a diferenciação entre os tipos I e III (que dentre todos os tipos de colágeno são os mais abundantes). Em nossos experimentos também utilizamos a coloração de picrossirius red (P.R.) a qual possibilita uma análise das fibras colágenas, através da diferente interferência de cores, intensidade e birrefringência dos tecidos corados, diferenciando

principalmente as fibras colágenas tipo I e tipo III. Neste caso, as fibras tipo I se apresentam como fibras grossas, altamente birrefringentes e na cor vermelha, enquanto que as fibras tipo III se apresentam em feixes finos, com fraca birrefringência e na cor amarelo-esverdeado. A análise de lâminas coradas com o P.R. também não revelou qualquer diferença na densidade dessas fibras colágenas entre os grupos (Figura 31 E,F).

As duas partes finais deste trabalho, apresentadas na sequência, focaram nos efeitos do estresse oxidativo em modular vias importantes para a manutenção do tônus na vasculatura e desencadeados com a estimulação dos receptores do tipo AT_1 pela angiotensina II, sendo: a via Rho-A/Rho-Quinase (ROCK) e a ativação de enzimas metaloproteinases de matriz (MMPs).

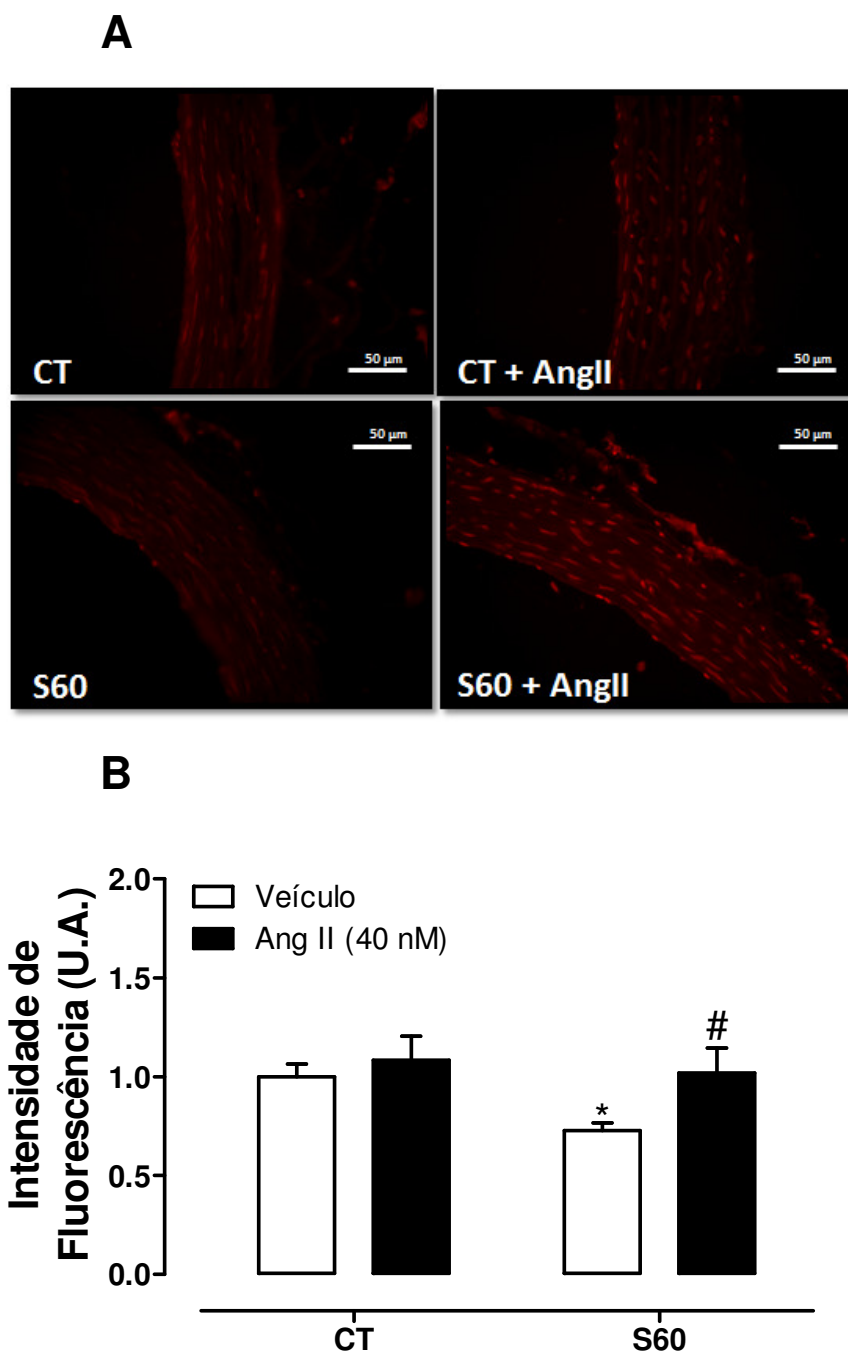


Figura 29. Níveis aumentados de EROs após estimulação com angiotensina II em aorta no pós-sepse. A) As imagens representam a produção de EROs detectada pela sonda fluorescente DHI em aortas obtidas dos ratos dos grupos controle (CT) e pós-sepse S60, estimulado com veículo ou angiotensina II (Ang II; 40 nM). Imagens adquiridas em microscópio invertido com aumento de 40x. **B)** Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média (n=6). A diferença entre os grupos foi avaliada pela análise de variância (ANOVA), seguida pelo pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ quando comparado ao controle (CT) - veículo; # $p < 0,05$ quando comparado S60+Veículo x S60+Ang II.

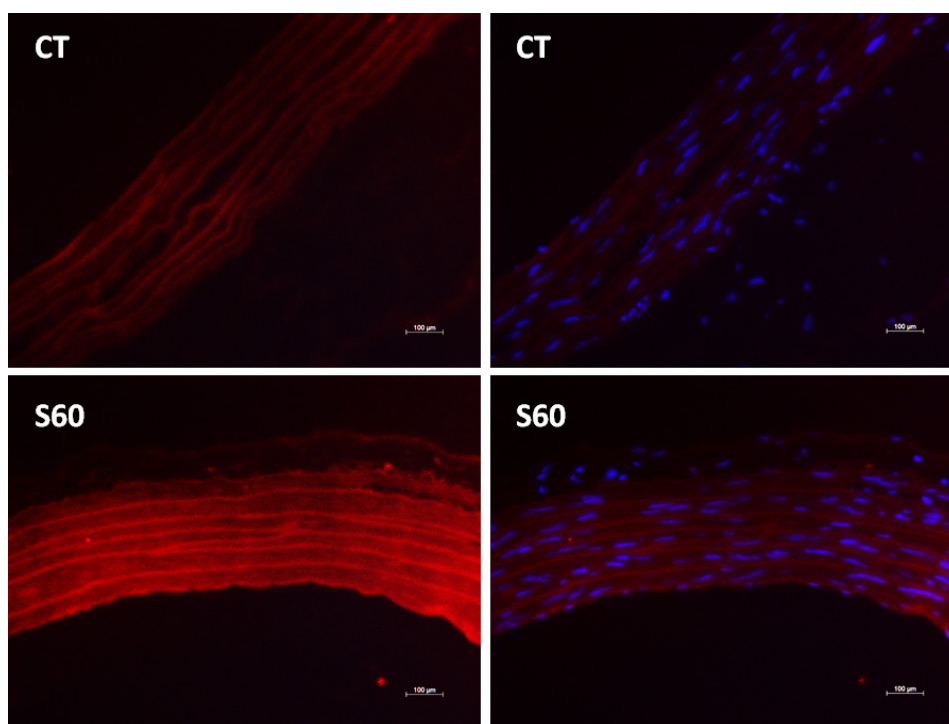
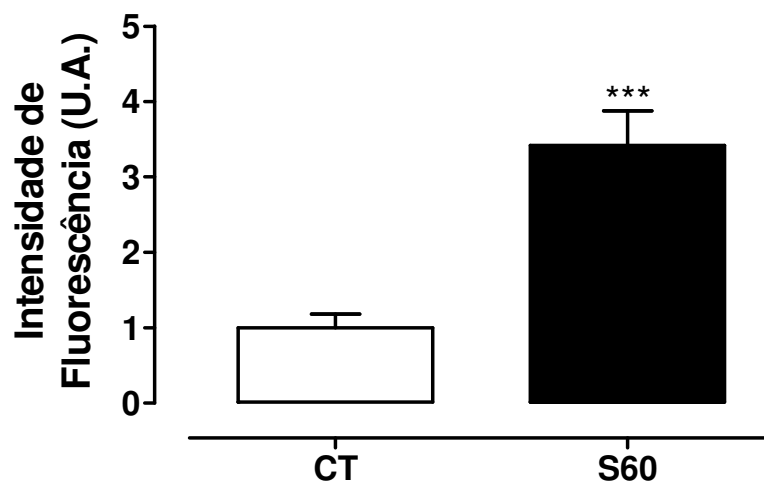
A**B**

Figura 30. Aumento dos níveis de peroxinitrito em aorta no pós-sepse. As imagens representam os níveis de peroxinitrito detectados pela marcação com o anticorpo fluorescente para nitrotirosina em aorta obtidos dos ratos dos grupos controle (CT) e pós-sepse S60). A marcação do núcleo aparece em azul. Imagens adquiridas em microscópio invertido com aumento de 40x. Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média (n=6). A diferença entre os grupos foi avaliada pelo teste *t* de Student. *** $p < 0,001$ quando comparado ao controle (CT).

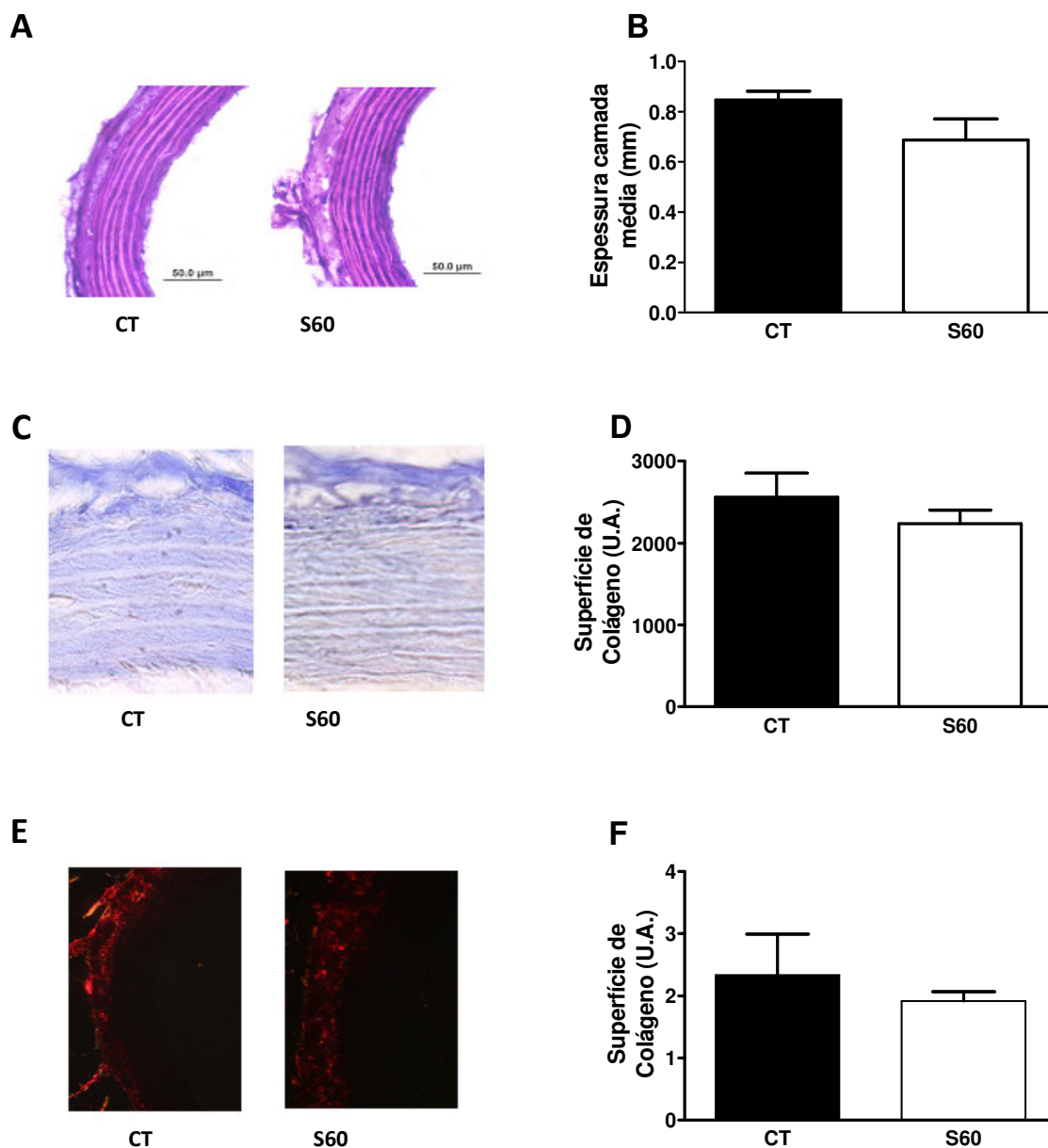


Figura 31. Parâmetros histológicos em aorta de animais dos grupos controle (CT) e pós-sepse S60. **A)** Imagens representativas e **B)** Medida da espessura da camada média em cortes aórticos corados com hematoxilina e eosina. **C)** Imagens representativas e **D)** medida da superfície de colágeno total em cortes aórticos corados com tricrômico de mallory. **E)** Imagens representativas e **F)** medida da superfície de colágeno (fibras tipo I e III) em cortes aórticos corados com picrosirius red. Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média (n=5). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (teste *t* de Student).

4.5. PARTE V

4.5.1. ENVOLVIMENTO DA VIA Rho-A/ROCK NA HIPER-CONTRATILIDADE VASCULAR NO PÓS-SEPSE

Já está bem estabelecido que a via de sinalização intracelular evocada por diversos vasoconstritores, dentre eles a angiotensina II, envolve a ativação de uma pequena GTPase, a Rho-A, que exerce muitas funções biológicas e está envolvida em uma ampla variedade de doenças associadas ao aumento do tônus ou da reatividade da musculatura lisa (WETTSCHURECK & OFFERMANN, 2002). As Rho-quinases (ROCK) I e II são os principais efetores deste sistema de transdução de sinais, e por isso avaliamos o relaxamento das preparações de aorta, pré-contraídas com fenilefrina, obtidas dos ratos dos grupos CT e pós-sepse S60 induzido pelo composto Y-27632, um inibidor da ROCK. Observamos um deslocamento para a direita da curva de relaxamento induzida pelo Y-27632 obtidas em anéis de aorta do grupo pós-sepse S60 quando comparada ao CT (Figura 32). A CE50 e seus intervalos de confiança calculados para os grupos CT e S60 foram de 0,43 (0,33-0,55) e 1,03 (0,76-1,40) μ M, respectivamente.

Para explorar a participação da via Rho-A/ROCK na hiper-reatividade à angiotensina II em vasos de animais do grupo pós-sepse S60, avaliamos a contração induzida pela angiotensina II na presença do composto Y-27632. Quando as preparações de ambos os grupos foram previamente incubadas com o composto Y-27632 (0,3 μ M) ocorreu inibição da contração induzida pela angiotensina II no grupo CT (Figura 33A), mas não nos anéis aórticos obtidos dos animais do grupo pós-sepse S60 (Figura 33B), sugerindo uma maior atividade na via Rho-A/ROCK nesses vasos. É importante destacar que somente quando aumentamos a concentração de composto Y-27632 para 1 μ M uma redução na resposta contrátil a angiotensina II foi obtida nas aortas dos ratos do grupo pós-sepse S60, de forma semelhante ao observado em anéis do grupo CT (dados não mostrados).

Na sequência avaliamos a expressão de proteínas importantes desta via, observando-se um aumento na expressão de Rho-A em aortas obtidas do grupo pós-sepse S60 (Figura 34) associado a uma maior expressão de ROCK II (Figura 35B) sem alterar a expressão de ROCK I (Figura 35A). Por isso, avaliamos também os níveis da proteína MYPT-1 (uma subunidade regulatória da MLCP), tanto na sua

forma total como fosforilada. Nossos resultados revelaram um aumento na expressão de MYPT-1 na sua forma fosforilada (Thr 850) sem alteração na expressão da forma total (Figuras 37B e 36, respectivamente).

Em suma esses resultados nos permitem sugerir que a atividade aumentada da via Rho-A/ROCK interfere com o equilíbrio entre as atividades da MLCK e da MLCP, fosforilando e conseqüentemente inativando a subunidade de ligação da MLCP (MYPT-1). Como a MLCP remove fosfato da MLC fosforilada para promover relaxamento, a inibição de sua atividade pela ROCK promove o estado fosforilado da MLC e contribui para o aumento da contração no grupo pós-sepse S60 em resposta à angiotensina II.

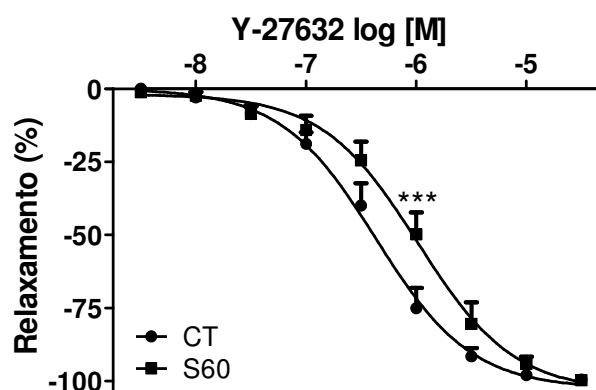


Figura 32. Deslocamento para a direita da CE50 induzida pelo composto Y-27632 em anéis de aorta obtidos dos ratos pós-sepse S60. Relaxamento em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina obtidos dos animais pós-sepse S60 e em seus respectivos controles (CT) em resposta ao composto Y-27632, um inibidor da ROCK. Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média (n=5). A diferença entre os grupos foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni. ***p<0,001 quando comparado ao controle (CT).

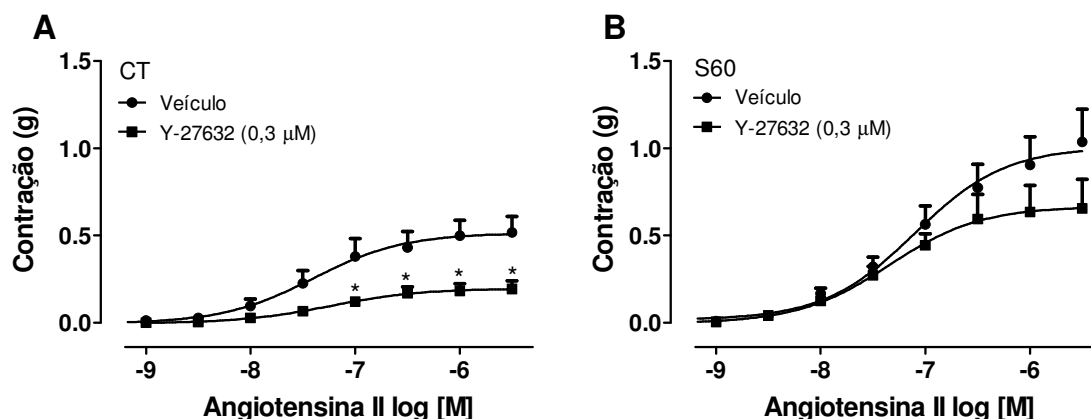


Figura 33. Ausência de influência da inibição da ROCK na resposta contrátil da angiotensina II no pós-sepse. Reatividade à angiotensina II na presença de veículo ou composto Y-27632 em anéis de aorta obtidos dos animais **A)** controles (CT) e **B)** pós-sepse S60. Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média (n=6). A diferença entre os grupos foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni. *p<0,05 quando comparado ao grupo CT.

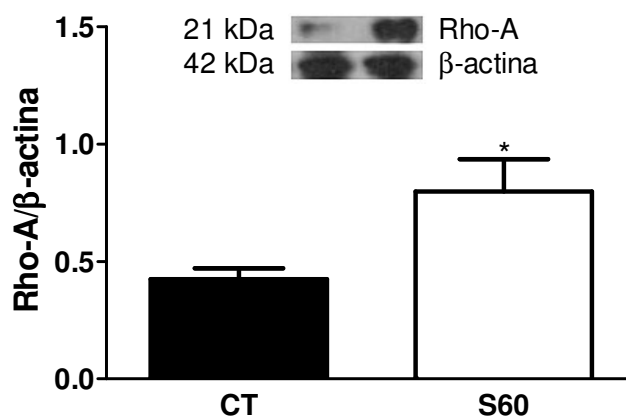


Figura 34. Aumento na expressão de Rho-A nos homogenatos aórticos no pós-sepse. Imagens representativas e análises densitométricas da proteína Rho-A em relação à β -actina. Os homogenatos aórticos foram obtidos dos animais controles (CT) e pós-sepse S60. Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média (n=4). A diferença entre os grupos foi verificada pelo teste *t* de Student. *p<0,05 quando comparado ao CT.

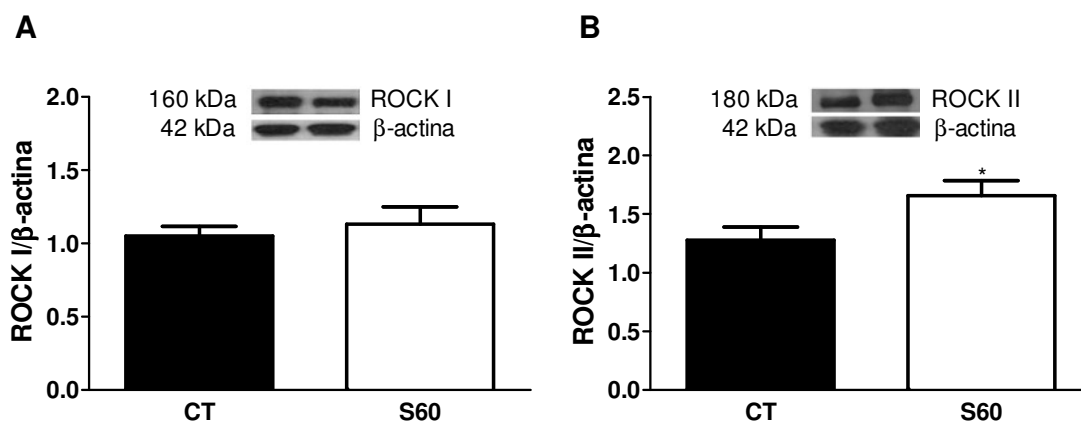


Figura 35. Aumento na expressão de ROCK II nos homogenatos aórticos no pós-sepse. Imagens representativas e análises densitométricas das proteínas **A)** ROCK I e **B)** ROCK II em relação à β-actina. Os homogenatos aórticos foram obtidos dos animais controles (CT) e pós-sepse S60. Resultados expressos como a média ± erro padrão da média (n=4). A diferença entre os grupos foi avaliada pelo teste *t* de Student. *p<0,05 quando comparado ao CT.

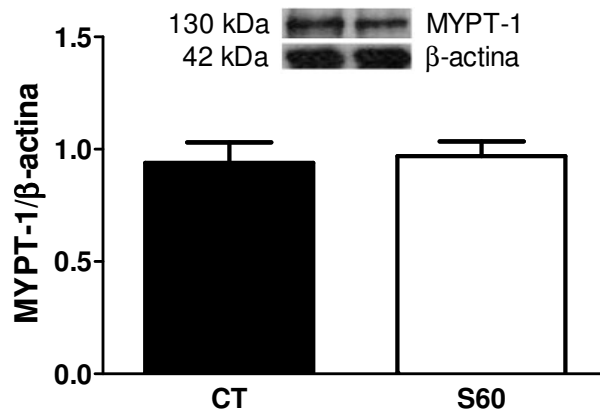


Figura 36. Expressão de MYPT-1 total nos homogenatos aórticos no pós-sepse. Imagens representativas e análises densitométricas da proteína MYPT-1 em relação à β-actina. Os homogenatos aórticos foram obtidos dos animais controles (CT) e pós-sepse S60. Resultados expressos como a média ± erro padrão da média (n=4). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (teste *t* de Student).

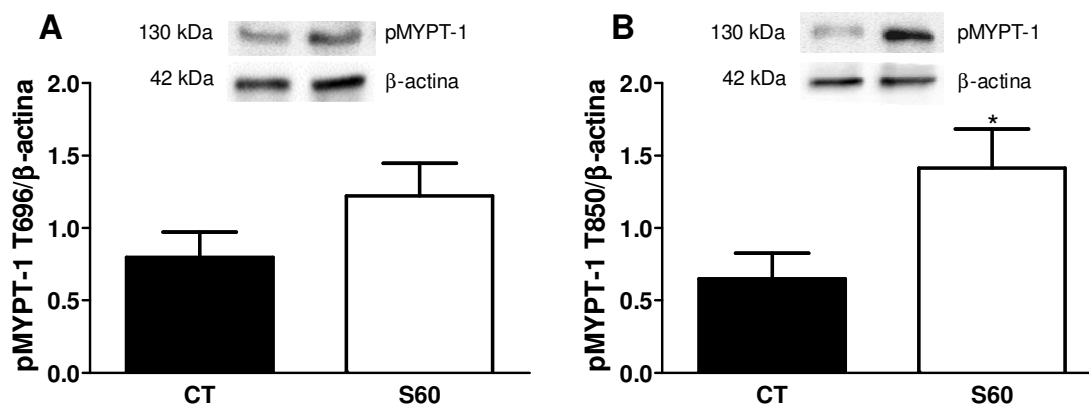


Figura 37. Aumento na expressão na forma fosforilada da MYPT-1 em homogenatos aórticos no pós-sepse. Imagens representativas e análises densitométricas da proteína pMYPT-1 **A)** Thr 696 e **B)** Thr 850 em relação à β -actina. Os homogenatos aórticos foram obtidos dos animais controles (CT) e pós-sepse S60. Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média (n=4). A diferença entre os grupos foi avaliada pelo teste *t* de Student. * $p < 0,05$ quando comparado ao CT.

4.6. PARTE VI

4.6.1. ENVOLVIMENTO DAS METALOPROTEINASES DE MATRIZ (MMPs) NA HIPER-CONTRATILIDADE VASCULAR NO PÓS-SEPSE

O estresse oxidativo aumentado e a ação do ONOO^- podem ativar um grupo de enzimas (endopeptidases) chamadas metaloproteinases de matriz extracelular (MMPs). As MMP-2 e -9 (também conhecidas como gelatinases A e B, respectivamente) são as principais MMPs envolvidas na fisiopatologia de várias doenças cardiovasculares (CHO *et al.*, 2007), principalmente quando relacionadas ao estresse oxidativo aumentado, onde a formação de peroxinitrito, especialmente na presença de glutathione, é capaz de modular a atividade dessas MMPs por um mecanismo de s-glutatioilação (VIAPPIANI *et al.*, 2009).

Antes de aprofundar a avaliação da participação das MMPs nas alterações vasculares tardias da sepse, realizamos experimentos a fim de verificar a participação das MMPs na hipocontratilidade a vasoconstritores existente durante a sepse (fase aguda). Estudos anteriores mostraram que a perda de contratilidade em aorta obtida de ratos tratados com lipopolissacarídeo (LPS) está relacionada à ativação intracelular da MMP-2 (CENA *et al.*, 2010; LALU *et al.*, 2006) e proteólise

de calponina-1, uma importante proteína ligante de cálcio (CASTRO *et al.*, 2012; de SOUZA *et al.*, 2014a). Entretanto, não existem estudos que suportem estes dados em modelos de sepse de origem polimicrobiana como a induzida por CLP, utilizada em nosso estudo. Uma vez que as alterações fisiopatológicas diferem significativamente entre os modelos de LPS e CLP, avaliamos a participação das MMPs na hipocontratilidade vascular no modelo de sepse induzido pelo CLP, conforme manuscrito enviado para publicação (de SOUZA *et al.*, 2014b). Em suma, os resultados deste trabalho demonstraram que o tratamento com inibidores de MMP (doxíciclina e ONO-4817) preveniram a perda de contratilidade em aorta (evidenciada em experimentos conduzidos 6 horas após a cirurgia de CLP) aos vasoconstritores (KCl, fenilefrina e angiotensina II), confirmando assim o efeito benéfico da inibição das MMPs durante à sepse.

Por esta razão investigamos qual o envolvimento das MMPs na hipercontratilidade à angiotensina II no grupo pós-sepse S60. Para isso, os anéis de aorta obtidos dos animais dos grupos CT e pós-sepse S60 foram pré-incubados com ditiotreitol (DTT 1 mM; um inibidor da S-glutatiolação) ou GM6001 (30 μ M; um inibidor de MMPs) seguidos pela adição de angiotensina II. Nenhum dos inibidores alterou a resposta contrátil da angiotensina II nos anéis do grupo CT (Figura 38A), mas ambos, apesar de não ser estatisticamente significativo, reduziram parcialmente a resposta à angiotensina II no grupo S60 (Figura 38B), sugerindo a participação das MMPs neste processo de hipercontratilidade à angiotensina II em aorta no pós-sepse.

Assim sendo, nossa próxima etapa foi verificar a existência de alterações tanto na atividade como na expressão das MMPs, de seus inibidores teciduais (TIMPs), e de possíveis substratos intracelulares das MMPs, quanto os efeitos da inibição das MMPs durante a fase aguda da sepse e sua relação com as alterações tardias do pós-sepse.

A Figura 39 mostra os efeitos do tratamento com um inibidor de MMPs, a doxíciclina (Dx), administrada por via oral na fase aguda da sepse (0, 24 e 48 hs após a cirurgia), uma vez ao dia, na dose de 15 mg/kg. Nestes experimentos, também incluímos grupos *sham-operated* (SO) tratados com veículo ou com Dx, além de um grupo NV e um grupo S60 tratado apenas com veículo). A administração de Dx na fase aguda da sepse não influenciou a resposta contrátil à angiotensina II nos grupos SO, e também não foi diferente dos grupos NV ou SO

tratado apenas com veículo. No entanto o tratamento com Dx na fase aguda da sepse foi capaz de prevenir a hiper-contratilidade para angiotensina II no grupo pós-sepse S60 em experimentos conduzidos em líquido nutritivo com e sem cálcio (Figura 39), sugerindo que a inibição das MMPs na fase inicial da sepse pode evitar o aparecimento de alterações vasculares tardias decorrentes do processo séptico. Entretanto, é importante destacar que o tratamento com doxiciclina não alterou a porcentagem de sobreviventes que se manteve em torno de 70% quando comparado ao grupo tratado apenas com veículo (dados não mostrados).

Na sequência avaliamos a expressão e atividade gelatinolítica da MMP-2 nos homogenatos aórticos obtidos de todos os grupos (NV, SO e S60 tratados com veículo, e SO e S60 tratados com Dx) onde encontramos tanto um aumento na expressão (Figura 40) quanto na atividade (Figura 41) da MMP-2. O tratamento com Dx na fase aguda da sepse foi capaz de prevenir essas alterações no grupo pós-sepse S60.

Além da MMP-2, diversos trabalhos mostram o envolvimento da MMP-9 na sepse. NAKAMURA *et al.*, (1998) evidenciou que pacientes sépticos não-sobreviventes apresentavam altos níveis de MMP-9 no sangue. Outros trabalhos demonstraram que a inibição da MMP-9 tem efeito protetor na letalidade associada à endotoxemia (DUBOIS *et al.*, 2002; HU *et al.*, 2005). Por isso, também avaliamos a expressão e atividade da MMP-9 nos homogenatos aórticos obtidos de todos os grupos (NV, SO e S60 tratados com veículo, e SO e S60 tratados com Dx). A expressão de MMP-9 nos homogenatos aórticos obtidos dos animais do grupo pós-sepse S60 tratados com veículo mostrou-se bastante elevada e da mesma maneira, o tratamento com inibidor de MMP na fase aguda foi capaz de evitar esse efeito (Figura 42). No entanto, não conseguimos detectar atividade gelatinolítica da MMP-9 pelo método de zimografia nos homogenatos aórticos em nenhum dos grupos avaliados. Por este motivo, avaliamos a atividade desta no plasma obtido dos ratos destes grupos experimentais. Como podemos visualizar na imagem representativa (Figura 43) encontramos um aumento bastante expressivo na atividade da MMP-9 na sua forma ativa (82 kDa) nos grupos pós-sepse S60, sem alteração na atividade em sua pró-forma (92 kDa). Para esta figura em especial não foi possível realizar a análise densitométrica devido a total ausência de atividade gelatinolítica nos grupos controles (NV e SO). Contudo, este aumento de atividade na forma ativa da MMP-9 foi detectado em todas as amostras dos grupos S60 avaliadas (n=4 por grupo).

As MMPs são inibidas por uma família de inibidores específicos, conhecidos como inibidores teciduais de MMPs (TIMPs). O equilíbrio entre a produção de MMPs e a de TIMPs é necessário para manter a homeostase da matriz extracelular. Por isso mensuramos a expressão de TIMP-1 e TIMP-4 nos homogenatos aórticos e conforme mostrado na Figura 44, não encontramos qualquer diferença na expressão das mesmas nas amostras obtidas de animais dos grupos pós-sepse S60, quando comparados aos grupos NV ou SO.

Avaliamos ainda a expressão de dois possíveis substratos intracelulares da MMP-2, a calponina-1 e a esmotelina-B (SMTL-B). Nossos resultados revelam que não há alteração na expressão destas proteínas no pós-sepse em nenhum dos grupos avaliados (Figura 45), sugerindo que as alterações funcionais, relacionadas a hiper-reatividade à angiotensina II, encontradas na vasculatura dos animais do grupo pós-sepse S60, não parecem envolver estas proteínas.

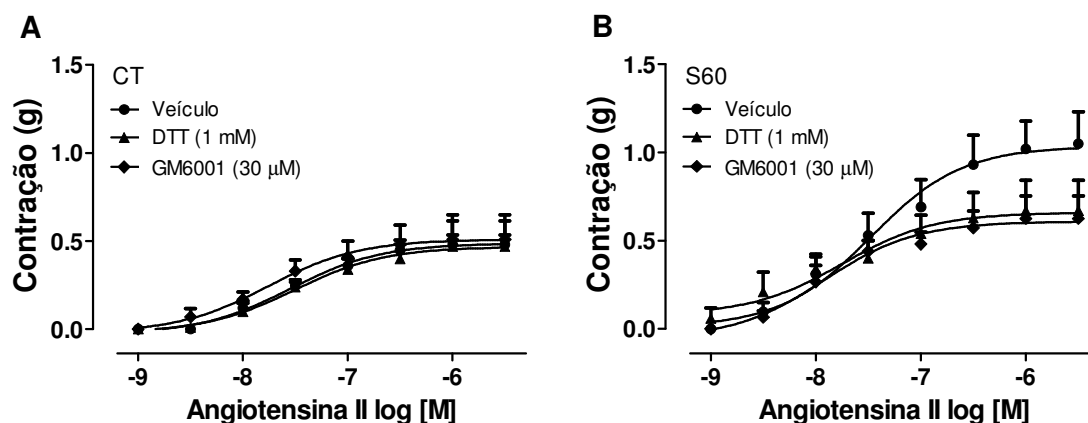


Figura 38. Influência do DTT e GM6001 na resposta contrátil à angiotensina II em aorta no pós-sepse. Reatividade à angiotensina II na presença de veículo, DTT (1 mM; inibidor da S-glutatioilação) ou GM6001 (30 μM; inibidor de MMPs) em anéis de aorta obtidos dos animais dos grupos **A)** controle (CT) e **B)** pós-sepse S60. Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média (n=6). A diferença entre os grupos foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni.

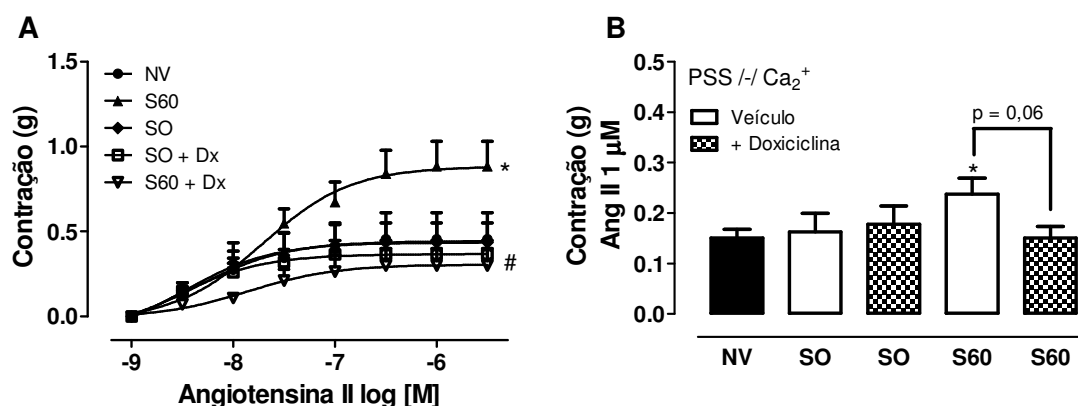


Figura 39. Efeito do tratamento com doxiciclina na fase aguda da sepse sobre a reatividade vascular à angiotensina II no pós-sepse. Reatividade à angiotensina II em anéis de aorta obtidos de ratos dos grupos naive (NV), sham-operated (SO) e pós-sepse S60 tratados apenas com veículo, e sham-operated (SO + Dx) e pós-sepse S60 (S60 + Dx) tratados com doxiciclina (Dx). **A**) curva concentração resposta (CCR) para angiotensina II em líquido nutritivo com cálcio; e **B**) contração para angiotensina II em líquido nutritivo sem cálcio. Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média (n=6). A diferença entre os grupos foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni. *p<0,05 quando comparado ao controle (NV ou SO); #p<0,05 quando comparado ao S60.

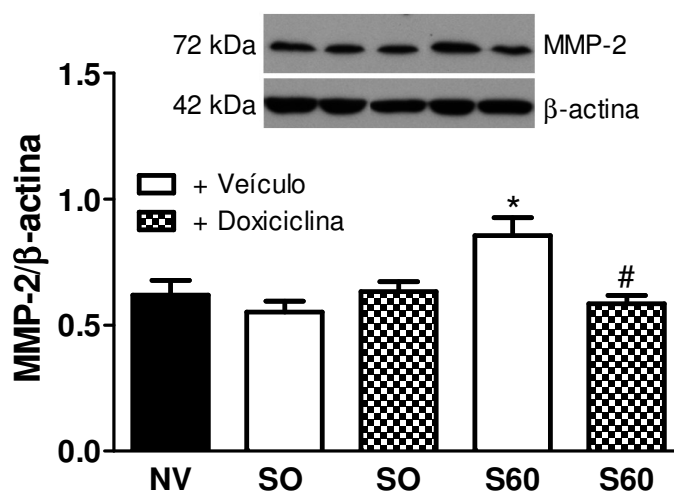


Figura 40. Efeito do tratamento com doxiciclina na fase aguda da sepse sobre a expressão de MMP-2 em aorta no pós-sepse. Imagem representativa e análise densitométrica da proteína MMP-2 em homogenatos aórticos obtidos de ratos dos grupos naive (NV), sham-operated (SO) e pós-sepse S60 tratados apenas com veículo, e sham-operated (SO + Dx) e pós-sepse S60 (S60 + Dx) tratados com doxiciclina (Dx) em relação à β -actina. Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média (n=3-4). A diferença entre os grupos foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo pós-teste de Bonferroni. *p<0,05 quando comparado ao controle (NV ou SO); #p<0,05 quando comparado ao S60.

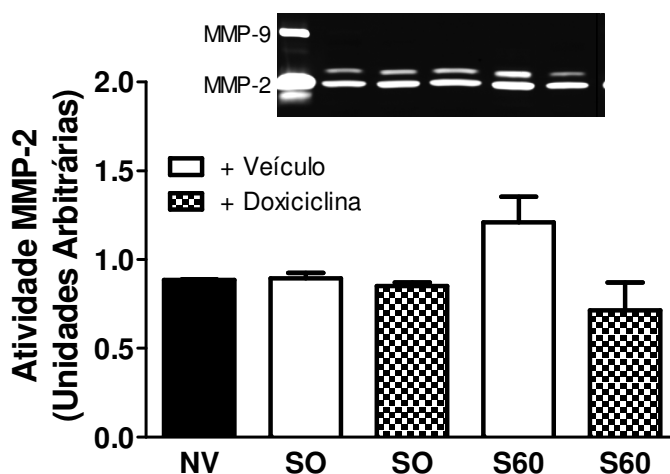


Figura 41. Efeito do tratamento com doxíciclina na fase aguda da sepse sobre a atividade da MMP-2 em aorta no pós-sepse. Imagem representativa e análise densitométrica da atividade da MMP-2 por zimografia em homogenatos aórticos obtidos de ratos dos grupos naïve (NV), sham-operated (SO) e pós-sepse S60 tratados apenas com veículo, e sham-operated (SO + Dx) e pós-sepse S60 (S60 + Dx) tratados com doxíciclina (Dx) em relação ao controle (HT-1080, representado na primeira linha). Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média ($n=3-5$). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

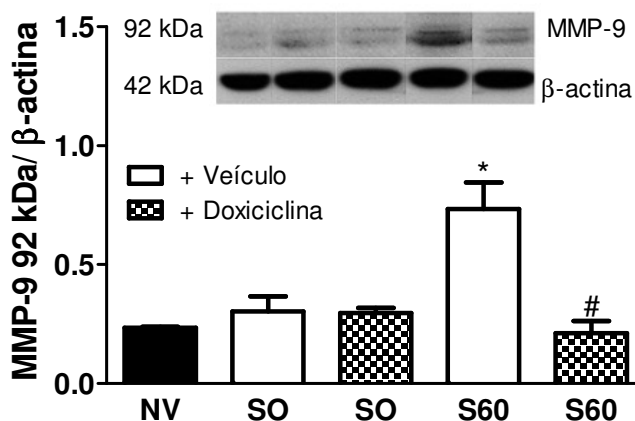


Figura 42. Efeito do tratamento com doxíciclina na fase aguda da sepse sobre a expressão de MMP-9 em aorta no pós-sepse. Imagem representativa e análise densitométrica da proteína MMP-9 em homogenatos aórticos obtidos de ratos dos grupos naïve (NV), sham-operated (SO) e pós-sepse S60 tratados apenas com veículo, e sham-operated (SO + Dx) e pós-sepse S60 (S60 + Dx) tratados com doxíciclina (Dx) em relação à β -actina. Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média ($n=3-4$). A diferença entre os grupos foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo pós-teste de Bonferroni. * $p<0,05$ quando comparado ao controle (NV ou SO); # $p<0,05$ quando comparado ao S60.

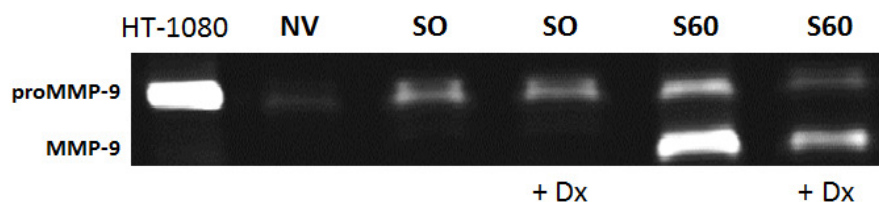


Figura 43. Efeito do tratamento com doxíciclina na fase aguda da sepse sobre a atividade da MMP-9 plasmática no pós-sepse. Imagem representativa da atividade gelatinolítica da MMP-9 pelo método de zimografia em plasma obtido de ratos dos grupos naïve (NV), sham-operated (SO) e pós-sepse S60 tratados apenas com veículo, e sham-operated (SO + Dx) e pós-sepse S60 (S60 + Dx) tratados com doxíciclina (Dx).

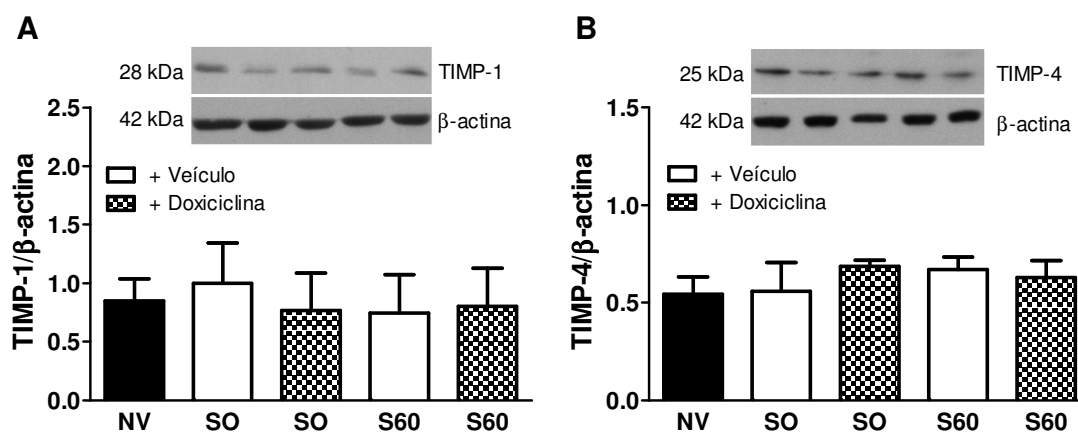


Figura 44. Efeito do tratamento com doxíciclina na fase aguda da sepse sobre a expressão de TIMP-1 e 4 em aorta no pós-sepse. Imagens representativas e análises densitométricas das proteínas **A)** TIMP-1 e **B)** TIMP-4 em homogenatos aórticos obtidos de ratos dos grupos naïve (NV), sham-operated (SO) e pós-sepse S60 tratados apenas com veículo, e sham-operated (SO + Dx) e pós-sepse S60 (S60 + Dx) tratados com doxíciclina (Dx) em relação à β-actina. Resultados expressos como a média ± erro padrão da média (n=3-4). A diferença entre os grupos foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo pós-teste de Bonferroni.

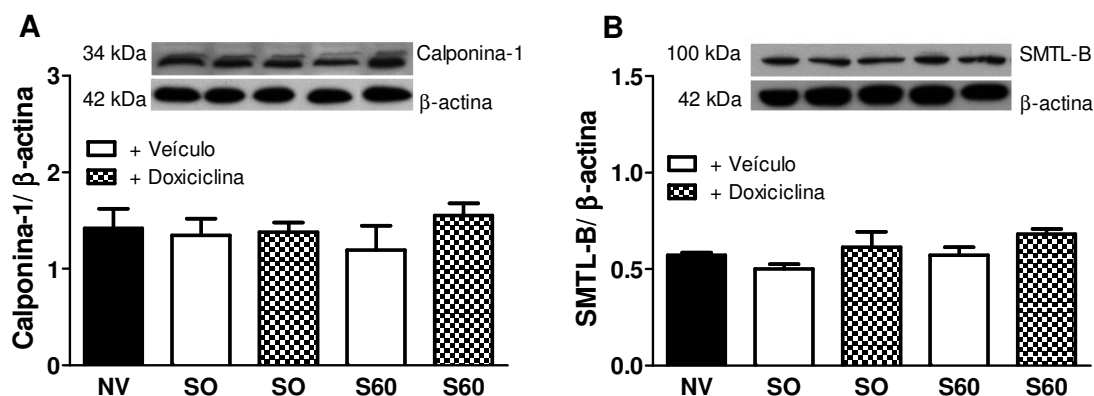


Figura 45. Efeito do tratamento com doxíciclina na fase aguda da sepse sobre a expressão de calponina-1 e SMTL-B em aorta no pós-sepse. Imagens representativas e análises densitométricas das proteínas **A)** calponina-1 e **B)** esmotelina (SMTL-B) em homogenatos aórticos obtidos de ratos dos grupos naive (NV), sham-operated (SO) e pós-sepse S60 tratados apenas com veículo, e sham-operated (SO + Dx) e sobreviventes pós-sepse S60 (S60 + Dx) tratados com doxíciclina (Dx) em relação à β -actina. Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média (n=3-4). A diferença entre os grupos foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo pós-teste de Bonferroni.

5. DISCUSSÃO

A sepse representa um grande desafio diagnóstico e terapêutico no Brasil e no mundo, figurando como umas das maiores causas de mortalidade em UTIs. Apesar de extensamente investigada e da expressiva produção de conhecimento acerca da sua fisiopatologia, diagnóstico e tratamento, um amplo universo de possibilidades permanece por ser explorado. Além disso, diversos estudos epidemiológicos revelam que, em poucos anos, o índice de mortalidade entre aqueles que sobrevivem ao episódio de sepse grave é surpreendentemente maior do que entre pessoas com a mesma faixa etária que nunca tiveram sepse. Entretanto, as evidências clínicas e experimentais que avaliam as sequelas cardiovasculares dos sobreviventes a sepse severa e/ou choque séptico são escassas.

Apesar de diversos estudos demonstrarem que a elevada letalidade da sepse não está restrita à fase aguda da doença, em nossos experimentos não observamos diferença na mortalidade em longo prazo dos ratos sobreviventes à sepse, quando estes foram acompanhados por um período 300 dias, e comparados com animais do grupo controle com a mesma faixa etária. Acreditamos que outros fatores contribuem para esta elevada mortalidade tardia que acomete os humanos, onde elencamos 2 pontos principais: 1) a faixa etária de maior prevalência do choque séptico nos humanos é entre idosos e nosso trabalho foi conduzido em ratos adultos jovens; 2) observa-se que idosos, quando comparados aos jovens, apresentam maior número de disfunções orgânicas e maior mortalidade, provavelmente em decorrência da presença de comorbidades (como por exemplo hipertensão e outras doenças cardiovasculares, diabetes e doenças respiratórias, dentre outros). Entretanto, apesar de não conseguir reproduzir esses dados experimentalmente, os achados do presente estudo mostram alterações funcionais e moleculares importantes e que podem contribuir para a mortalidade tardia associada à sepse. Ressaltamos também que sem a interferência de outros fatores, como a idade, imunodepressão, presença de comorbidades e uso crônico de medicação, dentre outros, como foi conduzido no nosso estudo, é possível afirmar que os achados tardios descritos neste trabalho são provenientes do processo séptico *per se*, e não de outros fatores causais.

Nossos resultados demonstram evidências de que os animais sobreviventes passaram por um episódio de sepse severa. Os níveis aumentados de nitrato/nitrito séricos, um indicativo da produção elevada de NO, associados a valores pressóricos reduzidos e refratariedade a vasoconstritores, como observamos em nosso estudo quando experimentos foram conduzidos 6 h após a indução da sepse, são frequentemente utilizados como parâmetro de confirmação do estado séptico na prática experimental e alguns deles também utilizados na prática clínica. Com esses experimentos demonstramos também que as alterações descritas acima estavam presentes somente no grupo de animais submetidos à ligadura e perfuração do ceco (nenhuma alteração foi encontrada nos animais dos grupos *naive* e *sham-operated*), o que possibilitou a escolha de animais *naive* como grupo controle nos experimentos do pós-sepse. A execução do nosso estudo tendo este grupo experimental como controle se aproxima melhor da maioria dos achados epidemiológicos, os quais comparam a população séptica, ou mesmo os sobreviventes, apenas com indivíduos da mesma faixa etária sem a presença de comorbidades. São escassos os trabalhos que avaliam os efeitos tardios entre os sobreviventes da sepse com uma população de pacientes que foram hospitalizados e diagnosticados como não-sépticos.

Os resultados do presente estudo demonstram, pela primeira vez, evidências experimentais que apontam para “sequelas” cardiovasculares no pós-sepse. Apesar da hipótese do nosso estudo estar baseada na existência de alterações cardiovasculares nos animais sobreviventes à sepse, nossos resultados revelaram a existência de valores pressóricos significativamente reduzidos nos animais pós-sepse. Embora esses resultados possam ser inicialmente associados à inexistência de alterações cardiovasculares, uma vez que estas estão frequentemente associadas à elevação da pressão arterial (como ocorre na hipertensão arterial sistêmica), uma análise mais detalhada dos nossos resultados revela que os níveis pressóricos reduzidos e a diminuição de volume urinário excretado encontrada nos animais pós-sepse, podem sugerir um comprometimento na regulação da pressão arterial a longo prazo. Assim como nos casos de hipertensão, a hipotensão está relacionada com risco de mortalidade cardiovascular (PERALTA *et al.*, 2014) e, portanto, avaliações clínicas e experimentais nestes aspectos devem ser consideradas.

A regulação da pressão arterial a longo prazo geralmente ocorre por mecanismos hormonais e ligados à volemia, onde o rim é responsável pela regulação da perda ou retenção hídrica. A diminuição da produção de urina pode ser um sinal de desidratação, insuficiência renal ou de obstrução urinária. No entanto, são mínimas as chances de que estas sejam as causas da redução de volume urinário observada nos animais sobreviventes à sepse, pois não observamos alterações de relevância biológica em outros parâmetros renais, tais como na excreção de eletrólitos, nos níveis séricos de ureia e creatinina, ou na pressão e fluxo sanguíneo renal. Contudo, é possível que a redução no débito urinário encontrada nos ratos sobreviventes possa refletir um mecanismo de regulação da pressão, na tentativa de elevar os níveis pressóricos, uma vez que os mesmos encontram-se reduzidos. Porém, vale ressaltar que os animais sobreviventes à sepse apresentaram níveis plasmáticos de nitrato/nitrito maiores do que animais do grupo controle, sugerindo que a redução dos níveis pressóricos, encontrada nos animais pós-sepse, pode estar associada a uma maior produção de NO, já que o mesmo tem papel fundamental no controle do tônus vascular. Em condições fisiológicas o NO é produzido nas células endoteliais pela isoforma endotelial da NOS (eNOS, também denominada NOS3) que converte o aminoácido L-arginina a NO + L-citrulina, catalisando a oxidação de cinco elétrons com a participação de NAD(P)H/NADP⁺ e do complexo cálcio/calmodulina (MALINSKI, 2005). Um aumento na produção de NO via eNOS poderia ainda explicar o aumento na reatividade sistêmica à acetilcolina e à bradicinina nos animais do grupo pós-sepse, uma vez que tanto a acetilcolina como a bradicinina promovem efeitos vasodilatadores e hipotensores ao estimularem receptores muscarínicos e bradicininérgicos, respectivamente, levando à ativação das células endoteliais e síntese de substâncias vasodilatadoras como o NO.

Outra observação interessante deste estudo foram as alterações hematológicas no pós-sepse, dentre as quais destacamos a redução de linfócitos e o aumento de granulócitos em amostras de sangue obtidas dos animais do grupo pós-sepse S60, quando comparados com seus respectivos controles. De forma muito interessante, estas alterações seguiram o padrão observado na fase aguda da sepse (6 h após a indução da sepse por CLP). Níveis aumentados de nitrato/nitrito plasmático também foram encontrados em amostras coletadas de animais nos tempos de 30 e 90 dias após à sepse (dados não mostrados). Entretanto, não

podemos inferir se esses níveis aumentados de NO ou as alterações em linfócitos e granulócitos permaneceram desde a fase aguda da sepse, ou se estão relacionados a algum dano desenvolvido ao longo do período de avaliação. Existem diversas evidências clínicas que relacionam eventos inflamatórios agudos com o aparecimento de complicações crônicas. Alguns autores sugerem que há uma correlação com a gravidade do evento inflamatório agudo inicial que causa alterações no sistema imunológico (inato e adquirido), que se manifesta não só por meses, mas muitas vezes durante anos após um insulto grave. Não estão bem esclarecidos os mecanismos responsáveis por essas consequências crônicas, porém alterações nos níveis de citocinas, quimiocinas, receptores do tipo *toll* (TLRs) e células dendríticas parecem estar presentes (BENJAMIN *et al.*, 2004).

O papel exercido pelos rins no controle de longo prazo da pressão arterial envolve múltiplos fatores, como por exemplo a ativação dos sistemas renina-angiotensina-aldosterona e arginina-vasopressina, que basicamente atuam na regulação da vasomotricidade e do equilíbrio hidroeletrólítico (BASSO *et al.*, 2008). Estes mecanismos trabalham independentemente ou em conjunto de forma a aumentar o volume e o tônus vascular. Um dos efeitos da ativação destes sistemas é a promoção de vasoconstrição arterial a fim de manter a pressão arterial adequada. Uma das consequências desta ativação é a ocorrência de redução no fluxo sanguíneo renal (FSR). Entretanto, o FSR se mantém notavelmente constante em uma ampla faixa de pressões arteriais sistêmicas (mecanismo de autorregulação) (BAYLIS & BRENNER, 1978), o que pode ser um dos fatores pelos quais não observamos diferenças quando o FSR nos animais pós-sepse foi avaliado pelo sistema laser *doppler*.

Curiosamente, observamos que em nossos experimentos as vias alteradas no pós-sepse (tanto *in vivo* como *in vitro*) foram justamente o sistema renina-angiotensina (SRA) e vasopressina (ou hormônio anti-diurético), responsáveis pela modulação hormonal da pressão arterial. A baixa pressão sanguínea faz com que os rins secretem renina pelas células justaglomerulares. A renina é uma enzima glicoprotéica que catalisa a conversão do angiotensinogênio em angiotensina I, que é convertida em angiotensina II pela enzima conversora de angiotensina (ECA). (DUKE *et al.*, 2005; GASPARO *et al.*, 2000; LO *et al.*, 1991). No presente estudo observamos que a administração intravenosa de angiotensina II induziu respostas hipertensoras de menor amplitude nos animais sobreviventes à sepse, quando

comparado aos controles, resultado que foi semelhante com a resposta à angiotensina II obtida em preparações de rim isolado, mas se contrapôs ao observado em artéria aorta, na qual houve aumento de resposta contrátil à angiotensina II. Desta forma podemos sugerir que, independentemente do SRA estar ou não mais ativo no pós-sepse, a resposta à angiotensina II varia de acordo com o leito arterial estudado. Com isso, outros experimentos são necessários para investigar as causas e o significado biológico destes efeitos em outros leitos, especialmente em artérias de resistência, estruturas que possuem características funcionais diferentes de grandes vasos, e que estão envolvidas diretamente com o controle da pressão arterial.

Já a vasopressina, um hormônio neurohipofisário, que figura entre os mais potentes vasoconstritores conhecidos, é liberada em resposta à hipovolemia ou hipotensão e serve como um mecanismo para protelar o colapso cardiovascular durante períodos de grande perda de sangue e/ou hipotensão. Os efeitos celulares da vasopressina são mediados principalmente por interações com seus três tipos de receptores, denominados V_{1a} , V_{1b} e V_2 . O receptor V_{1a} é o subtipo encontrado em maior densidade no músculo liso vascular e o V_2 nas células endoteliais e ducto coletor, aonde atua aumentando a reabsorção de água pelos túbulos renais, sem interferir na eliminação de Na^+ (INOUE *et al.*, 2001; LEE *et al.*, 2003). Em nossos experimentos observamos que ocorre um aumento de resposta para a vasopressina no pós-sepse, tanto *in vivo* (quando administrada via intravenosa) como *in vitro* (em experimentos conduzidos em rim e aorta isolada). Entretanto, até o momento não conseguimos viabilizar a quantificação dos níveis séricos de vasopressina, o que permitiria especular se há uma maior ou menor ativação deste sistema no pós-sepse. Independente desses novos experimentos, que serão realizados em breve, o aumento na reatividade à vasopressina não parece depender do leito estudado.

O aumento na resposta contrátil à vasopressina e à angiotensina II em anéis de aorta obtidos dos ratos do grupo pós-sepse ocorreu tanto na presença como na ausência de cálcio do meio extracelular. A regulação do fluxo de cálcio intracelular e a manutenção da contração no músculo liso é fundamental para a perfusão tecidual adequada. A elevação da concentração intracelular de cálcio resulta em maior ligação deste à calmodulina. O cálcio, ligado à calmodulina, ativa a quinase de cadeia leve de miosina (MLCK), que contribui para a fosforilação das miosinas (miosinas-P) (CARL *et al.*, 1996), possibilitando a interação entre os filamentos e a

contração muscular (BOLTON, 1979; SWEENEY *et al.*, 1994). Portanto, alterações no influxo de Ca^{2+} extracelular e/ou liberação intracelular deste íon influenciam no processo de contração e no tônus do músculo (VAN BREEMEN *et al.*, 1987). Os íons Ca^{2+} entram no citoplasma das células musculares lisas através da abertura dos canais de cálcio localizados na membrana após eventos de despolarização ou estimulação por agonistas. A liberação do Ca^{2+} dos estoques intracelulares é uma maneira secundária de aumentar as concentrações intracelulares de Ca^{2+} livre, desencadeada pela ativação de canais conhecidos como receptores rianodina (RyR) (ZUCCHI & RONCA-TESTONI, 1997), ou pela ligação do 1,4,5-trifosfato de inositol (IP_3) aos seus receptores (IP_3R) (FERRIS & SNYDER, 1992), abrindo os canais e permitindo a liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares para o citosol (SOMLYO & SOMLYO, 1994). O relaxamento do músculo liso ocorre quando há recaptção do Ca^{2+} para os estoques intracelulares, após dissociação final do complexo cálcio-calmodulina, e a defosforilação da cadeia leve regulatória da miosina fosfatase (MYPT-1) promovida por uma fosfatase de cadeia leve da miosina (MLCP), ou ainda quando substâncias exógenas interferem na abertura dos canais de Ca^{2+} de membrana ou dos reservatórios intracelulares (ANDERSSON *et al.*, 2004). Nesse sentido, vários mecanismos contribuem para uma alteração na recaptção de cálcio, incluindo mecanismos dependentes de Ca^{2+} -ATPase do retículo sarco(endo)plasmático (SERCA) (CORTES *et al.*, 1997; LEVITSKY *et al.*, 1993; LOMPRES, 1999) e alterações na sinalização em condições de depleção do retículo, o que leva à ativação de canais de Ca^{2+} de membrana plasmática (LIOU *et al.*, 2005; ROOS *et al.*, 2005).

Nossos resultados demonstraram que não houve diferença na CCR para o CaCl_2 entre os grupos pós-sepse S60 e controle, sugerindo que as alterações contráteis na vasculatura parecem não envolver a entrada de Ca^{2+} do meio extracelular. No entanto, quando avaliamos a contração induzida pela vasopressina e angiotensina II em meio livre de cálcio na presença de taspargina, a hipercontratibilidade encontrada no pós-sepse S60 foi totalmente revertida, sugerindo uma desregulação na atividade da SERCA nos vasos dos animais sobreviventes à sepse. A SERCA é primeiramente responsável pela manutenção de baixos níveis citosólicos e de altos níveis lumenais de Ca^{2+} no retículo sarcoplasmático (PERIASAMY *et al.*, 2008). Alterações na atividade e/ou expressão da SERCA podem comprometer a recaptção de cálcio para dentro do retículo

sarcoplasmático. Existem 3 subtipos principais de SERCA (1, 2 e 3), que são expressos de forma diferenciada em diversos tipos celulares. Nos vasos encontram-se os subtipos 2 e 3, principalmente a SERCA-2. As SERCAs têm sua atividade regulada pela proteína fosfolambam⁷ que quando em sua forma não fosforilada inibe as Ca^{2+} -ATPase. Apesar de ainda não termos avaliado a expressão destas proteínas e de outros receptores que participam da regulação do fluxo de cálcio do citosol para o retículo sarcoplasmático, e vice-versa, podemos sugerir que alterações na atividade ou expressão da SERCA (ou de outros componentes regulatórios, como por exemplo a fosfolambam) podem ocorrer nos vasos dos animais sobreviventes à sepse.

A contração vascular induzida pela vasopressina na presença do DTM-AVP (um antagonista seletivo de receptores V_{1a}), ou pela angiotensina II na presença do losartan (um antagonista seletivo de receptores AT_1), não diferiu entre os grupos controle e o pós-sepse S60. Além disso, a avaliação da expressão dos receptores V_{1a} e V_2 da vasopressina, e AT_1 da angiotensina II, não demonstrou qualquer diferença entre os grupos, sugerindo que, ao menos no tecido aórtico, a hipercontratibilidade à vasopressina e à angiotensina II não envolve diferenças na expressão de receptores, reforçando a possibilidade de que esse fenômeno parece estar relacionado com a ativação de vias de sinalização intracelulares.

Em nosso estudo também avaliamos a participação do endotélio nas alterações de reatividade vascular observadas no pós-sepse. O endotélio vascular tem papel importante na regulação da fisiologia circulatória (BRUNNER *et al.*, 2006; DEANFIELD *et al.*, 2005; VIRDIS *et al.*, 2010), incluindo a manutenção ou controle do tônus vascular, através da liberação de substâncias vasodilatadoras e de fatores constritores (FELIZZOLA *et al.*, 1996). Demonstramos que o aumento de resposta contrátil à angiotensina II em vasos obtidos dos animais pós-sepse do grupo S60 estavam presentes apenas em preparações com endotélio funcional/intacto, o que sugere que os mecanismos responsáveis por este efeito parecem ser dependentes do endotélio. Ademais, quando avaliamos os efeitos da angiotensina II na presença do L-NAME (um clássico inibidor não seletivo das NO sintases), a hiper-

⁷A fosfolambam quando fosforilada pela proteína quinase dependente de AMPc (KIRCHBERGER *et al.*, 1974; TADA *et al.*, 1975), pela proteína quinase dependente da Ca^{2+} /calmodulina (CAMK) (LE PEUCH *et al.*, 1979), ou pela proteína quinase C (MOVSESIAN *et al.*, 1984) não inibe a atividade da SERCA.

contratilidade no pós-sepse também foi evitada, levantando a hipótese de que a resposta contrátil aumentada em aortas obtidas dos animais sobreviventes à sepse estaria relacionada com uma disfunção endotelial.

A angiotensina II promove seus efeitos relacionados à regulação da vasomotricidade e ao equilíbrio hidroeletrolítico através da ativação de receptores do subtipo AT_1 , enquanto poucos efeitos, geralmente opostos àqueles desencadeados pela ativação de AT_1 , têm sido atribuídos à ativação de receptores do subtipo AT_2 . Dentre outros efeitos, a ligação da angiotensina II aos receptores AT_1 ativa a enzima pró-oxidante NADPH oxidase no endotélio vascular e células do músculo liso, aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como o ânion superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O organismo dispõe de mecanismos chamados de sistemas antioxidantes, os quais são capazes de prevenir os danos que estas EROs poderiam causar no organismo. Os mecanismos são classificados por sistemas enzimáticos, composto pela superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx); e por sistemas não-enzimáticos, como a vitamina E, vitamina C e carotenóides, dentre outros (GATE *et al.*, 1999).

Embora seja uma enzima constitutiva, a NADPH oxidase vascular pode ser regulada por vários fatores humorais, além de citocinas, fatores de crescimento e agentes vasoativos (TOUYZ & SCHIFFRIN, 2004). Vários estudos mostram que a angiotensina II pode aumentar a expressão das principais subunidades relacionadas à atividade enzimática, contribuindo para o aumento da produção e atividade das EROs nos vasos (LANDMESSER *et al.*, 2002). Outras enzimas pró-oxidantes que podem gerar EROs na vasculatura incluem a xantina oxidase, o complexo citocromo P450 e as enzimas mitocondriais da cadeia respiratória, dentre outras (TANIYAMA & GRIENDLING, 2003). Entretanto, a contribuição destas enzimas para a produção de EROs pode ser relativamente menor quando comparado com a atividade da NADPH oxidase vascular.

Como o endotélio vascular é um órgão sede de inúmeros processos de óxido-redução, além de todas as células vasculares (célula endotelial, célula da musculatura lisa vascular – VSMC e fibroblastos) produzirem espécies reativas, tanto de oxigênio como de nitrogênio (TOUYZ & SCHIFFRIN, 2004), passamos a investigar a contribuição do estresse oxidativo para as alterações na reatividade vascular no pós-sepse. Em algumas circunstâncias a produção crônica de EROs

pode exceder a capacidade celular enzimática e não enzimática de produção de antioxidantes e, portanto, contribuir para o surgimento ou manutenção de doenças vasculares. Nossos resultados demonstraram níveis elevados de hidroperóxidos lipídicos (que são comumente relacionados com a produção de EROs) e glutathiona (que alguns autores sugerem estar aumentada em situações de intenso estresse oxidativo; por exemplo MAK *et al.*, 1996) nos homogenatos aórticos obtidos dos animais no pós-sepse, associados a uma redução na atividade total da SOD. A SOD é a principal enzima envolvida na eliminação do O_2^- , convertendo-o em H_2O_2 . Existem 3 formas de SOD: 1) CuZn-SOD, ligada aos íons cobre e zinco, presente no citoplasma e núcleo celular; 2) Mn-SOD, ligada ao íon manganês, presente nas mitocôndrias e 3) SOD extracelular (EC-SOD), presente no plasma, linfa e líquido sinovial. Fisiologicamente, quantidades basais de O_2^- intracelular atuam como moléculas sinalizadoras, participando da regulação da função endotelial e contração/relaxamento vascular (SALVEMINI & CUZZOCREA, 2002).

Por estas razões, avaliamos e demonstramos em experimentos funcionais que quando apocinina (um inibidor da NADPH), SOD e tempol (sequestrador de O_2^-) foram adicionadas às preparações de aorta obtidas dos animais sobreviventes à sepse, a hiper-contratilidade à angiotensina II era abolida, o que sugere que, uma vez restaurada a capacidade antioxidante, o vaso volta a responder de forma similar ao grupo controle a esse vasoconstritor. De forma interessante, observamos que apesar dos baixos níveis de EROs detectadas por técnica de fluorescência no tecido aórtico dos animais pós-sepse em condições basais, quando o tecido foi estimulado com angiotensina II essa produção foi significativamente mais elevada, o que não ocorreu nos cortes aórticos obtidos dos animais do grupo controle, sugerindo que em um sistema íntegro e funcional essa produção de EROs é inativada pelo sistema antioxidante, o que não ocorre nos tecidos obtidos dos animais do grupo pós-sepse, provavelmente devido à redução na atividade da SOD. Nossos resultados também demonstraram um aumento bastante expressivo na marcação para nitrotirosina nos cortes aórticos obtidos dos animais do grupo pós-sepse, um indicativo da produção de peroxinitrito ($ONOO^-$), uma vez que $ONOO^-$ reage com a tirosina formando a nitrotirosina. Em conjunto esses resultados podem indicar que a redução nos níveis basais de EROs detectadas em aorta no pós-sepse podem refletir uma maior formação de $ONOO^-$, uma vez que o O_2^- associado ao NO resulta na formação do $ONOO^-$. Esta poderia ser uma das razões pelas quais a hiper-contratilidade à

angiotensina II no pós-sepse só acontece na presença de endotélio, onde o O_2^- liberado não é dismutado pela ação da SOD, complexando-se com o NO e formando o $ONOO^-$, contribuindo para o desequilíbrio entre os fatores constritores e relaxantes derivados do endotélio e acarretando o aumento da contratilidade descrita neste estudo.

O $ONOO^-$ é um potente oxidante responsável por inibir a função enzimática, causar danos em DNA, induzir a peroxidação de lipídios e a adição de nitratos às proteínas. O $ONOO^-$ pode ainda se decompor gerando outros radicais como a hidroxila ($\cdot OH$) e o dióxido de nitrogênio ($\cdot NO_2$) (HOGG *et al.*, 1993; OHARA *et al.*, 1994). Além disso, é descrito que as espécies reativas de nitrogênio (ERNs) estimulam a expressão da γ -glutamilcisteína sintetase, via AP-1, promovendo aumento da síntese de GSH (CHO *et al.*, 1999). Como nossos achados demonstraram um aumento nos níveis de GSH nos homogenatos aórticos obtidos dos animais pós-sepse do grupo S60, é possível que esse aumento do GSH seja uma consequência dos níveis aumentados de $ONOO^-$, o que corrobora também com o aumento de hidroperoxidação lipídica encontrada no pós-sepse.

Na última década o papel das EROs e ERNs no sistema cardiovascular têm sido objeto de interesse e de muitas pesquisas. Tem sido descrito que os efeitos das EROs e ERNs sobre o sistema cardiovascular envolvem a inativação de NO, a estimulação de muitas quinases, a regulação e a diferenciação celular e a modulação de matriz extracelular (TOUYZ & SCHIFFRIN, 2004). Estudos em artérias demonstraram que as EROs e ERNs podem promover tanto a vasoconstrição como a vasodilatação, através de uma ação direta nas células musculares lisas ou através de uma ação indireta, provocando alteração na produção ou na atuação dos mediadores vasoativos (RUBANYI, 1988). O tecido vascular pode responder de formas diferentes a mudanças nas forças mecânicas a que está sujeito. Enquanto mudanças agudas podem ser balanceadas apenas por alterações no tônus vasomotor, alterações crônicas frequentemente envolvem algum grau de remodelamento estrutural (COWAN & LANGILLE, 1996). Entretanto, as análises histológicas obtidas no nosso estudo não revelaram alterações na espessura da camada média da aorta, apesar da angiotensina II ter reconhecida ação em processos como proliferação celular e fibrose tecidual (SUZUKI *et al.*, 2003). Da mesma forma, um dos principais constituintes da artéria aorta, as fibras colágenas (DOBRIN *et al.*, 1984), não encontram-se alteradas, sugerindo que a

hiper-contratibilidade à angiotensina II e o estresse oxidativo observados no pós-sepse não acarretam alterações na estrutura morfológica do vaso.

Nos últimos anos diversas evidências experimentais têm demonstrado que as EROs podem influenciar a função do sistema de transdução Rho-A/Rho-quinase (ROCK) no músculo liso vascular (CHEN *et al.*, 2014), como em doenças vasculares, incluindo a hipertensão pulmonar (JERNIGAN *et al.*, 2008), a hipertensão (JACKSON *et al.*, 2008; TSAI & JIANG, 2010) e doença cerebrovascular (MILLER *et al.*, 2010). A Rho-A, que pertence a superfamília de proteínas ligadas a proteína G pequena, pode ser ativada por vários agentes vasoconstritores, como por exemplo a angiotensina II (LEUNG *et al.*, 1995). Em seu estado inativo, a Rho-A se liga ao GDP e forma um complexo com os inibidores da dissociação do GDP no citosol. Quando o fator de troca (GEF) é ativado por receptores acoplados à proteína G, como por exemplo o receptor AT₁ da angiotensina II, há uma facilitação da troca do GDP por GTP. A Rho-A ligada ao GTP migra para a membrana plasmática e ativa a quinase dependente de Rho (ROCK) (SOMLYO & SOMLYO, 2003). As ROCK I e II são os principais efetores deste sistema de transdução de sinais; no músculo liso, após a ativação pela Rho-A, fosforilam a MLCP (especificamente a subunidade 1 da miosina fosfatase – MYPT-1). A MLCP na sua forma fosforilada tem sua atividade inibida e, dessa forma, a desfosforilação da cadeia leve de miosina (MLC) não acontece. A MLC quando fosforilada pela MLCK (quinase de cadeia leve de miosina) promove a interação entre actina e miosina, gerando a contração (LOIRAND *et al.*, 2006).

Em nosso estudo demonstramos que o relaxamento obtido com o composto Y-27632 (o qual atua competindo com o ATP em seu sítio de ligação na ROCK, tendo por isso uma ação inibitória sobre a atividade da ROCK I e da ROCK II) (DARENFED *et al.*, 2007), em anéis de aorta obtidos dos animais pós-sepse, apresentou um deslocamento significativo para a direita, o que poderia sugerir uma maior atividade da via Rho-A/ROCK. Também demonstramos que a presença do composto Y-27632 (em concentrações efetivas) nas preparações aórticas, não foi capaz de inibir a contração induzida pela angiotensina II no grupo pós-sepse, ao contrário do que ocorreu nas aortas do grupo controle, reforçando a ideia de que esta via de transdução estaria mais ativa nos animais pós-sepse. O aumento da atividade da via Rho-A/ROCK em aortas dos ratos do grupo S60 foi confirmado através da metodologia de WB, na qual verificamos um aumento na expressão de

Rho-A, ROCK II e MYPT-1 na sua forma fosforilada. Diversos autores têm relacionado as alterações no tônus arterial em resposta à angiotensina II com a elevação na via Rho-A/ROCK. Por exemplo, no trabalho conduzido por JIN *et al.*, (2006), os autores demonstraram que o tratamento com angiotensina II causa um aumento na expressão da Rho-A, evento este que era revertido pelo tratamento com inibidores de NADPH oxidase. Logo estes achados sugerem que o estresse oxidativo aumentado pode atuar modulando a via Rho-A/ROCK que, uma vez aumentada, contribui para o aumento da resposta contrátil à angiotensina II na vasculatura dos animais pós-sepse.

O estresse oxidativo aumentado e a ação do ONOO^- podem ainda ativar um grupo de enzimas (endopeptidases) chamadas metaloproteinases de matriz extracelular (MMPs). O papel mais conhecido das MMPs, as quais são expressas em vários tipos de tecidos, incluindo células da musculatura lisa, endotélio, miocárdio, fibroblastos, leucócitos polimorfonucleares e células inflamatórias, é a degradação de constituintes da matriz celular e das membranas basais (CHOW *et al.*, 2007; GALIS & KHATRI, 2002).

Existem pelo menos 23 tipos de MMPs, as quais são compostas por um sítio catalítico contendo Zn^{2+} e cálcio e de um pró-peptídeo ligado ao sítio catalítico por uma ligação sulfidríla (RAFFETTO & KALIL, 2008). Grande parte das MMPs possuem também uma região conhecida como “hemopexin-like”, responsável pelo reconhecimento e adesão aos componentes da matriz extracelular (BODE & MASKOS, 2003). As MMPs são sintetizadas como pró-formas, enzimaticamente inativas e denominadas de zimogênios (NAGASE & WOESSNER, 1999). Assim, a ativação enzimática das MMPs requer a remoção do domínio pró-peptídeo por meio da degradação deste por outras proteases, tais como plasmina, ou por MT-MMPs (MMPs do tipo membrana), dentre outras (MURPHY & NAGASE, 2008).

Dentre as diversas MMPs, as MMP-2 (72-kDa gelatinase A) e MMP-9 (92-kDa gelatinase B) têm merecido destaque por terem um papel importante na fisiopatologia de várias doenças cardiovasculares (CHO *et al.*, 2007). Essas gelatinases, especificamente, são responsáveis pela degradação dos componentes da membrana basal, tais como colágeno tipo IV, V e laminina, além do colágeno tipo I e III, da elastina e da fibronectina, entre outros papéis desenvolvidos (NAGASE & MURPHY, 2006).

Estudos *in vitro* mostraram que o aumento da atividade destas MMPs pode estar relacionado diretamente ao estresse oxidativo gerado pela ativação de enzimas pró-oxidantes, tais como a NADPH oxidase vascular e a xantina oxidase. A formação de ONOO⁻, especialmente na presença de glutatona, é capaz de modular a atividade da MMP-2 por um processo de S-glutatiolação (VIAPPIANI *et al.*, 2009), que leva a ativação das precursoras pró-metaloproteinases sem a remoção do pró-peptídeo autoinibitório. Também há trabalhos mostrando que as EROs podem ativar a MMP-9 ao reagir com o grupo tiol que preserva a latência das MMPs (RAJAGOPALAN *et al.*, 1996). A MMP-2 é de particular importância na vasculatura arterial, pois além de possuir um papel importante na regulação do tônus vascular, devido a sua capacidade de clivar peptídeos vasoativos (por exemplo a *big* endotelina-1 em endotelina-1), também atua na proteólise de substratos intracelulares (GALIS & KHATRI, 2002).

Existem várias estruturas intracelulares que podem ser alvo da MMP-2 na vasculatura (CHOW *et al.*, 2007; CAUWE & OPDENAKKER, 2010). A calponina-1, uma importante proteína ligante de cálcio, foi primeiramente descrita como alvo da MMP-2 na vasculatura em ratos endotoxêmicos, o qual a proteólise da calponina-1 pela MMP-2 foi implicada nas alterações relacionadas a perda de resposta contrátil (CASTRO *et al.*, 2012). A participação das MMPs na refratariedade aos vasoconstritores que ocorre na fase aguda do choque séptico foi confirmado em animais submetidos à CLP (de SOUZA *et al.*, 2014), um modelo que reproduz de forma muito semelhante as principais manifestações clínicas da sepse em humanos (RITTIRSCH *et al.*, 2009).

Considerando todas as evidências que implicam as MMPs na fisiopatologia da sepse e os benefícios da sua inibição na fase aguda, e relacionando o estresse oxidativo evidenciado em nosso estudo a uma modulação nesta via das MMPs, demonstramos que a adição de DTT ou GM6001, inibidores da S-glutatiolação e das MMPs, respectivamente, preveniram a hiper-contratibilidade à angiotensina II nas preparações de aorta obtidas dos animais pós-sepse. Nossos achados demonstram também que a inibição da atividade das MMPs durante o choque séptico foi capaz de evitar a hiper-contratibilidade à angiotensina II no pós-sepse. A doxiciclina, um antibiótico da classe das tetraciclina, é um dos mais potentes inibidores não seletivos de MMPs (GOLUB *et al.*, 1991), o qual parece atuar rompendo a ligação entre o Zn²⁺ e o Ca²⁺ no sítio catalítico das MMPs (GARCIA *et al.*, 2005). Por ser o

único inibidor de MMPs aprovado para uso clínico pelo FDA (*Food and Drug Administration*), para o tratamento de doenças periodontais, foi escolhido para nosso estudo no pós-sepse. Vale destacar que os efeitos observados neste estudo não estão associados à prevenção da sepse em virtude da ação antibactericida desse agente, tendo em vista que na dose utilizada, a doxíciclina é incapaz de induzir efeitos antibióticos secundários (BEZERRA *et al.*, 2002; GOLUB *et al.*, 1998).

LALU *et al.*, (2004) demonstraram que os níveis aumentados da MMP-9 se correlacionam inversamente com a PAM de ratos endotoxêmicos, o que nos permite especular que o aumento na expressão e atividade da MMP-9 no pós-sepse pode também estar relacionada aos valores pressóricos reduzidos nestes animais sobreviventes, o que ainda permanece por ser melhor elucidado. Além disso, nossos resultados demonstraram que as alterações na expressão em aorta de MMP-2 e MMP-9 foram evitadas no grupo tratado com doxíciclina na fase aguda da sepse, sugerindo um papel protetor dos inibidores de MMP na fase tardia da sepse.

A regulação da atividade das MMPs pode envolver alterações de expressão gênica destas enzimas ou ativação de suas formas pró-latentes, podendo também ser controlada por meio de inibidores específicos, conhecidos como inibidores teciduais de MMPs (TIMPs). O equilíbrio entre a produção de MMPs e a produção de TIMPs é necessário para manter a homeostase da matriz extracelular. Sabe-se que um processo patológico da matriz extracelular pode se instalar quando houver excesso de atividade das MMPs nos tecidos (para revisão ver MURPHY & NAGASE, 2008). Apesar de nossos achados demonstrarem um aumento na expressão e atividade das MMP-2 e MMP-9 no pós-sepse, este evento não foi acompanhado por diferenças na expressão das TIMP-1 e TIMP-4 nos homogenatos aórticos dos grupos avaliados, e nem sofreu qualquer alteração com o tratamento com doxíciclina. Da mesma forma, não encontramos diferenças na expressão de calponina-1 e esmotelina-B (um possível candidato de proteólise da MMP-2 na vasculatura) no pós-sepse, o que nos sugere que as alterações na resposta contrátil encontradas nas aortas dos animais sobreviventes não envolvem alterações nestas proteínas.

De um modo geral, as alterações vasculares durante a fase aguda da sepse representam uma das principais manifestações deste processo patológico, que inclui a produção excessiva de mediadores vasodilatadores e uma perda de resposta para vasoconstritores, os quais juntamente com outros fatores (mediadores

inflamatórios, estresse oxidativo, perfusão tecidual inadequada, falência orgânica, dentre outros) contribuem para as “sequelas” no pós-sepse, onde demonstramos que a disfunção endotelial e vascular é marcada pelo aumento do estresse oxidativo e sua interação com as vias Rho-A/ROCK e MMPs. E neste sentido, ao menos em parte, o tratamento com inibidores das MMPs durante a fase aguda da sepse pode ser um futuro alvo terapêutico para tratamento e prevenção dos efeitos tardios da sepse.

Por fim, existem algumas limitações importantes no presente estudo que devem ser consideradas, além de questões que ainda precisam ser avaliadas: 1) nosso estudo foi conduzido em artéria aorta e seria interessante utilizar também artérias de resistência; 2) a medida da pressão arterial foi realizada apenas em animais anestesiados; 3) algumas dosagens plasmáticas e teciduais (p. ex. para determinação da atividade da ECA, angiotensina II e aldosterona) permanecem por serem avaliadas, além da determinação na expressão de proteínas importantes para a regulação do fluxo de cálcio citosólico como as SERCAs e PLB; 4) qual o benefício do tratamento com doxiciclina na fase aguda da sepse sob os níveis pressóricos dos animais pós-sepse?; 5) alguma isoforma específica da NOS é a responsável pelos níveis aumentados de NO nos animais pós-sepse?; 6) como estão os níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias nos animais sobreviventes?; 7) as sequelas tardias no pós-sepse permanecem desde o evento inflamatório agudo?; 8) as alterações na resposta contrátil na vasculatura seriam uma resposta do organismo aos níveis pressóricos reduzidos no pós-sepse?; 9) estas alterações na vasculatura dos animais pós-sepse poderiam trazer algum prejuízo na perfusão tecidual?; 10) como os animais sobreviventes responderiam a um insulto (cardiovascular, inflamatório)? Desse modo, outros estudos são necessários para melhor elucidar os mecanismos pelos quais os sobreviventes desenvolvem sequelas tardias associadas à sepse.

6. CONCLUSÃO

Em resumo os principais achados deste estudo, que estão representados na Figura 46, foram:

- 1) Os ratos sobreviventes à sepse apresentam níveis pressóricos e diurese reduzidos. Estas alterações podem ser uma consequência dos níveis elevados de NO_x nestes animais, o que por sua vez pode contribuir para o aumento na reatividade sistêmica à acetilcolina e bradicinina;
- 2) A resposta do rim isolado à vasopressina e angiotensina II apresentou perfil similar aos achados *in vivo*;
- 3) O aumento na contratilidade em aorta no pós-sepse em resposta à vasopressina e angiotensina II ocorreu tanto na presença como na ausência de Ca²⁺ no líquido nutritivo;
- 4) A inibição da SERCA com tapsigargina evitou o aumento de contratilidade aórtica à vasopressina e angiotensina II;
- 5) O aumento a resposta contrátil à angiotensina II em aorta foi dependente de endotélio;
- 6) Os homogenates aórticos obtidos dos animais pós-sepse apresentaram uma redução na atividade da SOD, além de níveis aumentados de GSH e LOOH;
- 7) Níveis aumentados de EROs foram detectados nos cortes aórticos obtidos dos animais pós-sepse após estimulação com angiotensina II, além de níveis elevados de peroxinitrito em condições basais;
- 8) A redução no estresse oxidativo modula negativamente o aumento da resposta contrátil à angiotensina II em aortas no pós-sepse;
- 9) O estresse oxidativo parece modular positivamente a via Rho-A/ROCK no pós-sepse, evidenciada principalmente pela menor sensibilidade ao inibidor da ROCK (Y-27632) e pela maior fosforilação da MYPT-1;
- 10) O estresse oxidativo parece modular também a via das MMPs evidenciada pela maior expressão e atividade das MMP-2 e MMP-9 no pós-sepse;
- 11) A adição de DTT (inibidor da S-glututiolação) e GM6001 (inibidor das MMPs) evitou a hiper-contratilidade à angiotensina II em aortas no pós-sepse;
- 12) O tratamento com doxiciclina, na fase aguda da sepse, preveniu o aparecimento do aumento de resposta contrátil à angiotensina II, sugerindo que a

ativação de MMPs durante a sepse, desempenha um papel crucial nas alterações vasculares tardias que aparecem em ratos sobreviventes à sepse.

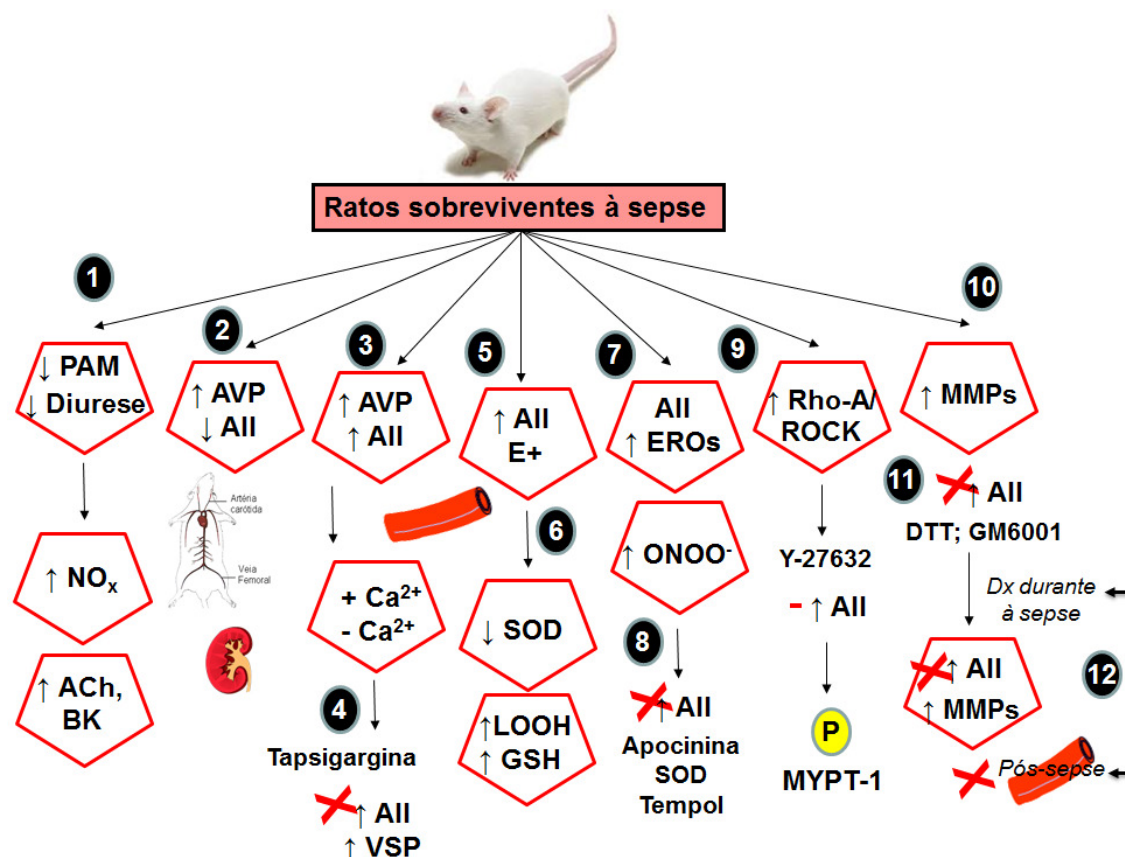


Figura 46. Principais alterações funcionais e moleculares nos ratos sobreviventes à sepse. A descrição detalhada da figura está na página 102, tópico conclusão. O símbolo X (em vermelho) representa as respostas que foram prevenidas com a adição de drogas *in vitro* ou *in vivo*. PAM - pressão arterial média; NO_x - nitrato e nitrito; ACh - acetilcolina; BK - bradicinina; AVP - vasopressina; AII - angiotensina II; E+ - dependente de endotélio; SOD - superóxido dismutase; LOOH - hidroperóxidos lipídicos; GSH - glutathione; EROs - espécies reativas de oxigênio; ONOO⁻ - peroxinitrito; ROCK - Rho-quinase; Y-27632 - inibidor da ROCK; MYPT-1 - unidade regulatória da fosfatase de cadeia leve de miosina; MMPs - metaloproteinases de matriz; DTT - ditioneitol, inibidor da S-glutatioilação; GM6001 - inibidor das MMPs; Dx - doxiciclina.

Como conclusão final, respondendo nossa hipótese de trabalho, os resultados obtidos no presente estudo permitem sugerir que à sepse causa alterações cardiovasculares que se manifestam ou perduram além do período tradicionalmente avaliados em estudos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, E.; SINGER, M. (2007) Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction. *Crit Care Med*;35:2408-16.

AEBI, H. (1974) Catalase. New York and London: Academic Press, pp. 673–677.

ALDERTON, W.K., COOPER, C.E., KNOWLES, R.G. (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* 357:593-615.

ALEXANDER, C.; RIETSCHER, E.T. (2001) Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotoxin Res*; 7:167-202.

American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference Committee: ACCP/SCCM Consensus Conference: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med*, 1992;20:864-874.

ANDERSSON, K.; ARNER, A. (2004) Urinary bladder contraction and relaxation: physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews*, 84: 935-986.

ANGUS, D.C.; BURGNER, D.; WUNDERINK, R.; MIRA, J.P.; GERLACH, H.; WIEDERMANN, C.J.; VINCENT, J.L. (2003) The PIRO Concept: P is for predisposition. *Crit Care* 7:248–251.

ANGUS, D.C.; LINDE-ZWIRBLE, W.T.; LIDICKER, J.; CLERMONT, G.; CARCILLO, J.; PINSKY, M.R. (2001) Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*;29:1303-10.

ANGUS, D.C.; MUSTHAFA, A.A.; CLERMONT, G.; GRIFFIN, M.F.; LINDE-ZWIRBLE, W.T.; DREMSIZOV, T.T.; PINSKY, M.R. (2001) Quality-adjusted survival in the first year after the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*; 163:1389–1394.

ANGUS, D.C.; VAN DER POLL, T. (2013) Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med.* Aug 29;369(9):840-51.

ANNANE, D.; VIGNON, P.; RENAULT, A.; BOLLAERT, P.E.; CHARPENTIER, C.; MARTIN, C.; TROCHÉ, G.; RICARD, J.D.; NITENBERG, G.; PAPAIZIAN, L.; AZOULAY, E.; BELLISSANT, E. (2007) Norepinephrine plus dobutamine versus epinephrine alone for management of septic shock: a randomised trial. *Lancet* 370(9588):676-684.

BALK, R.A. (2004) Optimum treatment of severe sepsis and septic shock: evidence in support of the recommendations. *Dis Mon* 50(4):168-213.

BARICHELO, T.; MARTINS, M.R.; REINKE, A.; FEIER, G.; RITTER, C.; QUEVEDO, J.; DAL-PIZZOL, F. (2005) Cognitive impairment in sepsis survivors from cecal ligation and perforation. *Crit Care Med.* Jan;33(1):221-3.

BAYLIS, C.; BRENNER, B.M. (1978) The physiologic determinants of glomerular ultrafiltration. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Volume 80, pp 1-46.

BELDER, A.J.; RADOMINSKI, M.W.; MARTIN, J.F.; MONCADA, S. (1995) Nitric oxide and the pathogenesis of heart muscle disease. *Eur J Clin Invest*; 25: 1-8.

BELLINGAN, G.J. (2002) The pathogenesis of ALI/ARDS. *Thorax*; 57:540–546.

BEZERRA, M.M.; BRITO, G.A.; RIBEIRO, R.A.; ROCHA, F.A. (2002) Low-dose doxycycline prevents inflammatory bone resorption in rats. *Braz J Med Biol Res*. May;35(5):613-6.

BIFF, D.; PETRONILHO, F.; CONSTANTINO, L.; VUOLO, F.; ZAMORA-BERRIDI, G.J.; DALL'IGNA, D.M.; COMIM, C.M.; QUEVEDO, J.; KAPCZINSKI, F.; DAL-PIZZOL, F. (2013) Correlation of acute phase inflammatory and oxidative markers with long-term cognitive impairment in sepsis survivors rats. *Shock*. Jul;40(1):45-8.

BOCHUD, P.V.; CALANDRA, T. (2003) Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment *BMJ*; 326:262-6.

BODE, W., MASKOS, K. (2003) Structural basis of the matrix metalloproteinases and their physiological inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Biol Chem*. 384, 863-872.

BOLTON, T. B. (1979) Mechanism of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiol. Ver*. 59: 606-718.

BONE, R.C. (1991) The pathogenesis of sepsis. *Ann Intern Med* 115: 457-469.

BOOKE, M.; MEYER, J.; LINGNAU, W.; HINDER, F.; TRABER, L.D.; TRABER, D.63L. (1995) Use of nitric oxide synthase inhibitors in animal models of sepsis. *New Horizons. The Society of Critical Care Medicine*; 3: 123-38.

BRUNNELL, E.; PARRILLO, J.E. (1996) Cardiac dysfunction during septic shock. *Clin Chest Med*;17:237-48.

BRUNNER, F.; BRÁS-SILVA, C.; CERDEIRA, A. S.; LEITE-MOREIRA, A. F. (2006) Cardiovascular endothelins: Essential regulators of cardiovascular homeostasis. *Pharmacology & Therapeutics*, v.111, p.508 – 531.

BURAS, J.A.; HOLZMANN, B.; SITKOVSKY, M. (2005) Animal models of sepsis: setting the stage. *Nat. Rev. Drug Discov*. 4, 854–865.

CAI, H.; HARRISON, D.G. (2000) Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*; 87:840–4.

CALANDRA, T. (2001) Pathogenesis of septic shock: implications for prevention and treatment. *J Chemother* 13 Spec No 1(1):173-180.

CARBONELL, L.F.; NADAL, J.A.; LLANOS, M.C.; HERNÁNDEZ, I.; NAVA, E.; DÍAZ, J. (2000) Depletion of liver glutathione potentiates the oxidative stress and decreases nitric oxide synthesis in a rat endotoxin shock model. *Crit Care Med*; 28:2002–2006.

CARL, A.; LEE, H. K.; SANDERS, K. M. (1996) Regulation of ion channels in smooth muscle calcium. *Ann. J. Physiol.* 271: C9-34.

CASTRO, M.M.; CENA, J.; CHO, W.J.; WALSH, M.P.; SCHULZ, R. (2012) Matrix metalloproteinase-2 proteolysis of calponin-1 contributes to vascular hypocontractility in endotoxemic rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32(3): 662-8.

CAUWE, B.; OPDENAKKER, G. (2010) Intracellular substrate cleavage: a novel dimension in the biochemistry, biology and pathology of matrix metalloproteinases. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 45: 351– 423.

CAUWELS, A. (2007) Nitric oxide in shock. *Kidney Int* 72(5):557-565.

CENA, J.J.; LALU, M.M.; CHO, W.J.; CHOW, A.K.; BAGDAN, M.L.; DANIEL, E.E.; CASTRO, M.M.; SCHULZ, R. (2010) Inhibition of matrix metalloproteinase activity in vivo protects against vascular hyporeactivity in endotoxemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298: H45–H51.

CHAVAN, S.S.; HUERTA, P.T.; ROBBIATI, S.; VALDES-FERRER, S.I.; OCHANI, M.; DANCHO, M.; FRANKFURT, M.; VOLPE, B.T.; TRACEY, K.J.; DIAMOND, B. (2012) HMGB1 mediates cognitive impairment in sepsis survivors. *Mol Med.* Sep 7;18:930-7.

CHEN, W.; LIU, D.J.; HUO, Y.M.; WU, Z.Y.; SUN, Y.W. (2014) Reactive oxygen species are involved in regulating hypocontractility of mesenteric artery to norepinephrine in cirrhotic rats with portal hypertension. *Int J Biol Sci.* Mar 15;10(4):386-95.

CHEW, D.K.; CONTE, M.S.; KHALIL, R.A. (2004) Matrix metalloproteinase-specific inhibition of Ca²⁺ entry mechanisms of vascular contraction. *J Vasc Surg.* 2004 Nov;40(5):1001-10.

CHO, S.; HAZAMA, M.; URATA, Y.; GOTO, S.; HORIUCHI, S.; SUMIKAWA, K.; KONDO T. (1999) Protective role of glutathione synthesis in response to oxidized low density lipoprotein in human vascular endothelial cells. *Free Radic Biol Med.* Mar;26(5-6):589-602.

CHO, W.J.; CHOW, A.K.; SCHULZ, R.; DANIEL, E.E. (2007) Matrix metalloproteinase-2, caveolins, focal adhesion kinase and c-Kit in cells of the mouse myocardium. *J Cell Mol Med.* Sep-Oct;11(5):1069-86.

CHOW, A.K.; CENA, J.; SCHULZ, R. (2007) Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature. *Br J Pharmacol* 152(2) :189-205.

CHRISTENSEN, K.L.; MULVANY, M.J. (2001) Location of resistance arteries. *Journal of vascular research*, v.38, n.1, p.1-12, 2001.

CICONELLI, R.M.; FERRAZ, M.B.; SANTOS, W.; MEINÃO, I.; QUARESMA, M.R. (1999) Tradução para a língua portuguesa e validação do questionário genérico de avaliação de qualidade de vida SF-36 (Brasil SF-36). *Rev Bras Reumatol*;39:143–50.

CLOWES, G.H.A.; VUCINIC, M.; WEIDNER, M.G. (1966) Clinical review: Myocardial depression in sepsis and septic shock. *Ann Surg*. 163: 844-866.

CNUBBEN, N.H.P.; RIETJENS, I.M.C.M.; WORTELBOER, H.; ZANDEN, J.; BLADEREN, P.J. (2001) The interplay of glutathione-released process in antioxidant defense. *Enviromental Toxicology and Pharmacology*, v.10, p.141-152.

COHEN, J. (2009) Sepsis. *Medicine* 37:10.

CONNOR, A.J.; CHEN, L.C.; JOSEPH, L.B.; LASKIN, J.D.; LASKIN, D.L. (2013) Distinct responses of lung and liver macrophages to acute endotoxemia: role of toll-like receptor 4. *Exp Mol Pathol*; 94, 216-27.

CONTRIN, L.M.; PASCHOAL, V.D.; BECCARIA, L.M.; CESARINO, C.B.; LOBO, S.M.A. (2013) Qualidade de vida de sobreviventes de sepse grave após alta hospitalar. *Rev. Latino-Am. Enfermagem* vol.21 no.3 Ribeirão Preto.

CORTES, S. F., LEMOS, V. S. e STOCLET, J. C. (1997) "Alterations in calcium stores in aortic myocytes from spontaneously hypertensive rats." *Hypertension* 29(6): 1322-1328.

COWAN, D.B.; LANGILLE, B.L. (1996) Cellular and molecular biology of vascular remodeling. *Curr Opin Lipidol*. Apr;7(2):94-100.

CUTHBERTSON, B.H.; ELDERS, A.; HALL, S.; TAYLOR, J.; MACLENNAN, G.; MACKIRDY, F.; MACKENZIE, S.J.; the Scottish Critical Care Trials Group and the Scottish Intensive Care Society Audit Group. (2013) Mortality and quality of life in the five years after severe sepsis. *Crit Care*. Apr 16;17(2):R70.

DAL-PIZZOL, F.; PASQUALI, M.; QUEVEDO, J.; GELAIN, D.P.; MOREIRA, J.C. (2012) Is there a role for high mobility group box 1 and the receptor for advanced glycation end products in the genesis of long-term cognitive impairment in sepsis survivors? *Mol Med*. Dec 20;18:1357-8.

DARENFED, H.; DAYANANDAN, B.; ZHANG, T.; HSIEH, S.H.; FOURNIER, A.E.; MANDATO, C.A. (2007) Molecular characterization of the effects of Y-27632. *Cell Motil Cytoskeleton*. Feb;64(2):97-109.

DEANFIELD, J.; DONALD, A.; FERRI, C.; et al. (2005) Endothelial function and dysfunction. Part I: Methodological issues for assessment in the different vascular

beds: a statement by the Working Group on Endothelin and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *J Hypertens* 23(1):7-17.

DEITCH, E.A. (2005) Rodent models of intra-abdominal infection. *Shock* 24 (Suppl. 1):19–23.

DELLINGER, R.P. (2003) Cardiovascular management of septic shock. *Crit Care Med*; 31:946–55.

DE SOUZA, P.; CASTRO, M.M.; GOOBIE, G.; SILVA-SANTOS, J.E.; SCHULZ, R. (2014a) Smoothelin-B is not a target of matrix metalloproteinase (MMP)-2 in the vasculature of endotoxemic rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 92: 1–5.

DE SOUZA, P.; SCHULZ, R.; SILVA-SANTOS, J.E. (2014b) Matrix metalloproteinase inhibitors prevent sepsis-induced refractoriness to vasoconstrictors in the cecal ligation and puncture model in rats. Manuscripto submetido ao periódico *Vascular Pharmacology*.

DIAS, F.S.; EIDT, M.V.; DUQUIA, R.P.; STRINGHI, F.; SCHWARTZMAN, C.; SZTILER, F.; GUERREIRO, M.O.; CANABARRO, M.S.; LEONHARDT, C. (2007) *Critical Care*, 11(Suppl 3):P20.

DOBRIN, P.B.; BAKER, W.H.; GLEY, W.C. (1984) Elastolytic and collagenolytic studies of arteries. *Arch Surg*; 119(4):405-9.

DUBOIS, B.; STARCKX, S.; PAGENSTECHE, A.; VAN DEN OORD, J.; ARNOLD, B.; OPDENAKKER, G. (2002) Gelatinase B deficiency protects against endotoxin shock. *European Journal of Immunology* 32, 2163-2171.

DUKE, L.M.; EVANS, R.G.; WIDDOP, R.E. (2005) AT2 receptors contribute to acute blood pressure-lowering and vasodilator effects of AT1 receptor antagonism in conscious normotensive but not hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288(5):H2289-2297.

FANTUZZI, L.; PUDDU, P.; VARANO, B.; DEL CORNO, M.; BELARDELLI, F.; GESSANI, S. (2000) IFN- α and IL-18 exert opposite regulatory effects on the IL-12 receptor expression and IL-12-induced IFN- γ production in mouse macrophages: novel pathways in the regulation of the inflammatory response of macrophages. *J Leukoc Biol*; 68(5):707–714.

FEIHL, F.; WAEBER, B.; LIAUDET, L. (2001) Is nitric oxide overproduction the target of choice for the management of septic shock? *Pharmacol Ther* 91:179-213.

FELIZZOLA, L.R.; ROSSINI SOBRINHO, J.R.; ZORN, W.G.W.; BELLEN, B.V. (1996) The role of the endothelium in circulatory physiology. *Cir. vasc. angi*;12(3):129-36.

FERRIS, C.D.; SNYDER, S.H. (1992) IP3 receptors. Ligand-activated calcium channels in multiple forms. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res.*;26:95-107.

FLEMMING, B.; SEELIGER, E.; WRONSKI, T.; STEER, K.; ARENZ, N.; PERSSON, P.B. (2000) Oxygen and renal hemodynamics in the conscious rat. *J Am Soc Nephrol*, v 11, p18-24.

FURCHGOTT, R. F. (1983) Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. *Circ Res*, 53(5): 557-573.

GALIS, Z.S.; KHATRI, J.J. (2002) Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res*, 90(3):251-62.

GARCIA, R.A.; PANTAZATOS, D.P.; GESSNER, C.R.; GO, K.V.; WOODS, V.L.; VILLARREAL, F.J. (2005) Molecular interactions between matrilysin and the matrix metalloproteinase inhibitor doxycycline investigated by deuterium exchange mass spectrometry. *Mol Pharmacol*;67(4):1128-36.

GASPARO, M.; CATT, K.J.; INAGAMI, T.; WRIGHT, J.W.; UNGER, T.H. (2000) The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev*; 52:415-72.

GATE, L.; PAUL, J.; BA, G.N.; TEW, K.D.; TAPIERO, H. (1999) Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomed Pharmacother*;53(4):169-80.

GOLUB, L.M.; LEE, H.M.; RYAN, M.E.; GIANNOBILE, W.V.; PAYNE, J.; SORSA, T. (1998) Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple non-antimicrobial mechanisms. *Adv Dent Res*. Nov;12(2):12-26.

GOLUB, L.M.; RAMAMURTHY, N.S.; MCNAMARA, T.F.; GREENWALD, R.A.; RIFKIN, B.R. (1991) Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown: new therapeutic implications for na old family of drugs. *Crit Rev Oral Biol Med*;2(3):297-321.

GODOY, P.H. (2003) Associação da doença cardiovascular preexistente com a mortalidade no paciente idoso com choque séptico. [Dissertação de Mestrado]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro.

GOODE, H.F.; COWLEY, H.C.; WALKER, B.E.; HOWDLE, P.D.; WEBSTER, N.R. (1995) Decreased antioxidant status and increased lipid peroxidation in patients with septic shock and secondary organ dysfunction. *Crit Care Med*; 23:646-651.

GRANJA, C.; DIAS, C.; COSTA-PEREIRA, A.; SARMENTO, A. (2004) Quality of life of survivors from severe sepsis and septic shock may be similar to that of others who survive critical illness. *Crit Care* 2004; 8:R91–R98.

GRIFFITHS, B.; ANDERSON, I.D. (2009) Sepsis, SIRS and MODS. *Surgery* 27:10.

HABIG, W.H.; PABST, M.J.; JAKOBY, N.B. (1974) Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*, 249, pp. 7130–7139.

HEARD, S.O.; FINK, M.P. (1991) Multiple organ failure syndrome – Part I: Epidemiology, prognosis, and pathophysiology. *Intensive Care Med*;6:279-294.

HEYLAND, D.K.; HOPMAN, W.; COO, H.; TRANMER, J.; MCCOLL, M.A. (2000) Long term health-related quality of life in survivors of sepsis. Short Form 36: a valid and reliable measure of health-related quality of life. *Crit Care Med*; 28:3599–3605.

HINSHAW, L.B. (1996) Sepsis / Septic shock: Participation of the microcirculation: Na abbreviated review. *Crit Care Med* 24: 1072-1078.

HOGG, N.; DARLEY-USMAR, V.M.; WILSON, M.T.; MONCADA, S. (1993) The oxidation of alpha-tocopherol in human low-density lipoprotein by the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide. *FEBS Lett.* Jul 12;326(1-3):199-203.

HOPKINS, R.O.; WEAVER, L.K.; POPE, D.; ORME, J.F.; BIGLER, E.D.; LARSON-LOHR, V. (1999) Neuropsychological sequelae and impaired health status in survivors of severe acute respiratory distress syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 160, 50-56.

HOTCHKISS, R.S.; KARL, I.E. (2003) The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* ;348:138-50.

HOTCHKISS, R.S.; SWANSON, P.E.; FREEMAN, B.D.; TINSLEY, K.W.; COBB, J.P.; MATUSCHAK, G.M.; BUCHMAN, T.G.; KARL, I.E. (1999) Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med*; 27:1230–1251.

HU, J.L.; VAN DEN STEEN, P.E.; DILLEN, C.; OPDENAKKER, G. (2005) Targeting neutrophil collagenase/matrix metalloproteinase-8 and gelatinase B/matrix metalloproteinase-9 with a peptidomimetic inhibitor protects against endotoxin shock. *Biochemical Pharmacology* 70, 535-544.

INOUE, T.; NONOGUCHI, H.; TOMITA, K. (2001) Physiological effects of vasopressin and atrial natriuretic peptide in the collecting duct. *Cardiovascular Research*, v.51, p.470-480.

JACKSON, E.K.; GILLESPIE, D.G.; ZHU, C. REN, J.; ZACHARIA, L.C.; MI, Z. (2008) Alpha2-adrenoceptors enhance angiotensin II-induced renal vasoconstriction: role for NADPH oxidase and RhoA. *Hypertension*; 51: 719-726.

JERNIGAN, N.L.; WALKER, B.R.; RESTA, T.C. (2008) Reactive oxygen species mediate RhoA/Rho kinase-induced Ca²⁺ sensitization in pulmonary vascular smooth muscle following chronic hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 295: L515-L529.

JIANG, Z.Y.; WOOLLARD, A.C.; WOLFF, S.P. (1991) Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids*, 26, pp. 853–856.

JIN, L.; YING, Z.; HILGERS, R. H.; YIN, J.; ZHAO, X.; IMIG, J. D.; WEBB, R. C. (2006) Increased RhoA/Rho-kinase signaling mediates spontaneous tone in aorta from angiotensin II-induced hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* 318(1): 288-295.

JONES, A.E.; PUSKARICH, M.A. (2009) CX Sepsis-Induced Tissue Hypoperfusion. *Crit Care Clin* 25: 769–779.

KIRCHBERGER, M. A., TADA, M. e KATZ, A. M. (1974) "Adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase-catalyzed phosphorylation reaction and its relationship to calcium transport in cardiac sarcoplasmic reticulum." *J Biol Chem* 249(19): 6166-6173.

KUMAR, A.; THOTA, V.; DEE, L.; OLSON, J.; URETZ, E.; PARRILLO, J.E. (1996) Tumor necrosis factor-alpha and interleukin1-beta are responsible for depression of in vitro myocardial cell contractility induced by serum from humans with septic shock. *J Exp Med*;183:949-58.

LALU, M.M.; CENA, J.; CHOWDHURY, R.; LAM, A.; SCHULZ, R. (2006) Matrix metalloproteinases contribute to endotoxin and interleukin-1beta induced vascular dysfunction. *Br J Pharmacol. Sep*;149(1):31-42.

LALU, M.M.; CSONT, T.; SCHULZ, R. (2004) Matrix metalloproteinase activities are altered in the heart and plasma during endotoxemia. *Crit Care Med* 32: 1332–1337.

LANDMESSER, U., HARRISON, D.G. (2002) Role of p47(phox) in vascular oxidative stress and hypertension caused by angiotensin II. *Hypertension* 40, 511-515.

LANDRY, D.W.; OLIVER, J.Á. (2001) The pathogenesis of vasodilatory shock. *N Engl J Med*;345:588-595.

LASSEGUE, B.; CLEMPUS, R.E. (2003) Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*;285:R277–97.

LAUPLAND, K.B.; ZYGUN, D.A.; DOIG, C.J.; BAGSHAW, S.M.; SVENSON, L.W.; FICK, G.H. (2005) One-year mortality of bloodstream infection-associated sepsis and septic shock among patients presenting to a regional critical care system. *Intensive Care Med*; 31:213–219.

LE PEUCH, C. J., HAIECH, J. e DEMAILLE, J. G. (1979) "Concerted regulation of cardiac sarcoplasmic reticulum calcium transport by cyclic adenosine monophosphate dependent and calcium--calmodulin-dependent phosphorylations." *Biochemistry* 18(23): 5150-5157.

LEE, C. R.; WATKINS, M. L.; PATTERSON, J. H.; GATTIS, W.; O'CONNOR C, M.; GHEORGHIADE, M.; ADAMS, K. F. (2003) Vasopressin: a new target for the treatment of heart failure. *Am Heart J* 146(1): 9-18.

LEITE, F.B.; PREDIGER, R.D.; SILVA, M.V.; DE SOUSA, J.B.; CARNEIRO, F.P.; GASBARRI, A.; TOMAZ, C.; QUEIROZ, A.J.; MARTINS, N.T.; FERREIRA, V.M. (2013) Role of nicotine on cognitive and behavioral deficits in sepsis-surviving rats. *Brain Res. Apr* 24;1507:74-82.

LEMOS, R.L.L.; OLIVEIRA, G.M.M.L.; DAVID, C.M.N.; GODOY, P.H.; LUIZ, R.R.; LEMOS, N.G.L.; FERREIRA, D.A.L. (2005) Cardiovascular Disease in Elderly Patients with Severe Sepsis and Septic Shock. *Revista da SOCERJ* – Vol. 18, n.4.

LEUNG, T.; MANSER, E.; TAN, L.; LIM, L. (1995) A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes. *J Biol Chem* 270(49): 29051-29054.

LEVITSKY, D. O., CLERGUE, M., LAMBERT, F., SOUPONITSKAYA, M. V., LE JEMTEL, T. H., LECARPENTIER, Y. e LOMPRES, A. M. (1993) Sarcoplasmic reticulum calcium transport and Ca^{2+} -ATPase gene expression in thoracic and abdominal aortas of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J Biol Chem* 268(11): 8325-8331.

LEVY, M.M. et al. (2003) 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med*; 31(4).

LEVY, M.M. et al. (2003) 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med*; 29:530–538.

LE-BARILLEC, K.; MAGALHAES, J.G.; CORCUFF, E.; THUIZAT, A.; SANSONETTI, P.J.; PHALIPON, A.; DI SANTO, J.P. (2005) Roles for T and NK cells in the innate immune response to *Shigella flexneri*. *J Immunol*;175:1735-40.

LIN, S.M.; WANG, Y.M.; LIN, H.C.; HUANG, C.D.; LIU, C.Y.; WANG, C.H.; KUO, H.P. (2008) Serum thrombomodulin level relates to the clinical course of disseminated intravascular coagulation, multiorgan dysfunction syndrome and morality in patients with sepsis. *Crit Care Med*; 36: 683-9.

LIU, J., KIM, M. L., HEO, W. D., JONES, J. T., MYERS, J. W., FERRELL, J. E., JR. e MEYER, T. (2005) "STIM is a Ca^{2+} sensor essential for Ca^{2+} -store depletion-triggered Ca^{2+} influx." *Curr Biol* 15(13): 1235-1241.

LO, M.; JULIEN, C.; BARRES, C.; MEDEIROS, I.; ALLEVAR, A.M.; VINCENT, M.; SASSARD, J. (1991) Blood pressure maintenance in hypertensive sympathectomized rats. II. Renin-angiotensin system and vasopressin. *Am J Physiol*. Oct;261(4 Pt 2):R1052-6.

LOIRAND, G.; GUÉRIN, P.; PACAUD, P. (2006) Rho Kinases in Cardiovascular Physiology and Pathophysiology. *Circulation Research*; 98:322-334.

LOMPRES, A. M. (1999) "Sarcoplasmic reticulum in vascular cells in hypertension and during proliferation." *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26(7): 553-557.

LOPEZ, A.; LORENTE, J.A.; STEINGRUB, J.; et al. (2004) Multiple-center, randomized, placebo-controlled, double-blind study of the nitric oxide synthase inhibitor 546C88: effect on survival in patients with septic shock. *Crit Care Med*; 32: 21-30.

LORENTE, J.A.; LANDIN, L.; RENES, E.; ESTEBAN, A. (1993) Regulation of vascular tone in sepsis. *Intensive Care World* 1993; 10: 58-62.

MAK, D.H.; IP, S.O.; LI, P.C.; POON, M.K.; KO, K.M. (1996) Alterations in tissue glutathione antioxidant system in streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol Cell Biochem*;162(2):153-8.

MALINSKI, T. (2005) Understanding nitric oxide physiology in the heart: a nanomedical approach. *Am J Cardiol*;96 Suppl 1:13-24.

MARIK, P.E.; VARON J. (1998) The hemodynamic derangements in sepsis: implications for treatment strategies. *Chest*, 1998;114:854-860.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. (1974) Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol: a convenient assay for superoxide dismutase enzyme activity. *European Journal of Biochemistry*, 47, pp. 469–474.

MARSHALL, J.C.; VINCENT, J.L.; FINK, M.P.; COOK, D.J.; RUBENFELD, G.; FOSTER, D.; FISHER, C.J.; FAIST, E.; REINHART, K. (2003) Measures, markers, and mediators: Toward a staging system for clinical sepsis. A Report of the Fifth Toronto Sepsis Roundtable, Toronto, Ontario, Canada, 25–26 October, 2000.

MAYR, F.B.; YENDE, S.; ANGUS, D.C. (2014) Epidemiology of severe sepsis. *Virulence* 5:1, 4–11; January 1.

MILLER, A.A.; BUDZYN, K.; SOBEY, C.G. (2010) Vascular dysfunction in cerebrovascular disease: mechanisms and therapeutic intervention. *Clin Sci (Lond)*; 119:1-17.

MOLLNAU, H.; WENDT, M.; SZOCS, K.; et al. (2002) Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. *Circ Res*; 90:E58–65.

MORENO, R.; VINCENT, J.L.; MATOS, R.; MENDONÇA, A.; CANTRINE, F.; THIJS, L.; TAKALA, J.; SPRUNG, C.; ANTONELLI, M.; BRUINING, H.; WILLATTS, S. (1999) The use of maximum SOFA score to quantify organ dysfunction/failure in intensive care: Results of a prospective, multicentre study. *Intensive Care Med*; 25:686–696.

MOVAT, H.Z.; CYBULSKY, M.I.; COLDITZ, I.G.; CHAN, M.K.; DINARELLO, C.A. (1987) Acute inflammation in gram-negative infection: endotoxin, interleukin 1, tumor necrosis factor, and neutrophils. *Fed Proc*. Jan;46(1):97-104.

MOVSESIAN, M. A., NISHIKAWA, M. e ADELSTEIN, R. S. (1984) "Phosphorylation of phospholamban by calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase. Stimulation of cardiac sarcoplasmic reticulum calcium uptake." *J Biol Chem* 259(13): 8029-8032.

MURPHY, G.; NAGASE, H. (2008) Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol Aspects Med*;29(5):290-308.

NAGASE, H., R, V., MURPHY, G. (2006) Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res.* 69, 562-573.

NAGASE, H.; WOESSNER JR, J.F. (1999) Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 274(31):21491-4.

NAKAMURA, T.; EBIHARA, I.; SHIMADA, N.; SHOJI, H.; KOIDE, H. (1998) Modulation of plasma metalloproteinase-9 concentrations and peripheral blood monocyte mRNA levels in patients with septic shock: Effect of fiber-immobilized polymyxin B treatment. *American Journal of the Medical Sciences* 316, 355-360.

NETEA, M.G.; VAN DER GRAAF, C.; VAN DER MEER, J.W.; KULLBERG, B.J. (2004) Toll-like receptors and the host defense against microbial pathogens: bringing specificity to the innate-immune system. *J Leukoc Biol*;75:749-55.

NOVACK, V.; TERBLANCHE, M.; ALMOG, Y. (2006) Do statins have a role in preventing or treating sepsis? *Crit Care*; 10:113.

O'BRIEN, J.M.; NAEEM, A.A.; ABEREGG, S.K.; ABRAHAM, E. (2007) Sepsis. *Am J. Med*;120:1012-22.

OHARA, A.; GATTI, R.M.; RADI, R. (1994) Spin-Trapping studies of peroxynitrite decomposition and of 3-morpholinopropanone N-ethylcarbamide autooxidation: direct evidence for metal-independent formation of free radicals intermediates. *Arch. Biochem. Biophys.*, Orlando, v.310, n.1,p.118-125.

PAPADOPOULOS, M.C.; DAVIES, D.C.; MOSS, R.F.; TIGHE, D.; BENNETT, E.D. (2000) Pathophysiology of septic encephalopathy: a review. *Crit. Care Med.* 28, 3019–3024.

PARKER, M.M. (1998) Pathophysiology of cardiovascular dysfunction in septic shock. *New Horiz*;6:130-38.

PARKER, M.M.; SHELHAMER, J.H.; BACHARACH, S.L.; GREEN, M.V.; NATANSON, C.; FREDERICK, T.M.; DAMSKE, B.A.; PARRILLO, J.E. (1984) Profound but reversible myocardial depression in patients with septic shock. *Ann Intern Med*;100:483-90.

PARRILLO, J.E. (1993) Pathogenetic mechanisms of septic shock. *N Engl J Med.* May 20;328(20):1471-7.

PAVON, A.; BINGUET, C.; KARA, F.; et al.; EPIdemiology of Septic Shock (EPISS) Study Group. (2013) Profile of the risk of death after septic shock in the present era: an epidemiologic study. *Crit Care Med.* Nov;41(11):2600-9.

PERALTA, C.A.; KATZ, R.; NEWMAN, A.B.; PSATY, B.M.; ODDEN, M.C. (2014) Systolic and Diastolic Blood Pressure, Incident Cardiovascular Events, and Death in Elderly Persons: The Role of Functional Limitation in the Cardiovascular Health Study. *Hypertension.* Jun 16. pii: HYPERTENSIONAHA.114.03831.

PERIASAMY, M.; BHUPATHY, P.; BABU, G. J. (2008) Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase pump expression and its relevance to cardiac muscle physiology and pathology. *Cardiovasc Res* 77, 265-273.

POLTORAK, A.; HE, X.; SMIRNOVA, I.; et al. (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr-4 gene. *Science*, 282:2085-2088.

PORTELLA, V.G.; SILVA-FILHO, J.L.; LANDGRAF, S.S.; DE RICO, T.B.; VIEIRA, M.A.; TAKIYA, C.M.; SOUZA, M.C.; HENRIQUES, M.G.; CANETTI, C.; PINHEIRO, A.A.; BENJAMIM, C.F.; CARUSO-NEVES, C. (2013) Sepsis-surviving mice are more susceptible to a secondary kidney insult. *Crit Care Med*. Apr;41(4):1056-68.

PÓVOA, P.R.; CARNEIRO, A.H.; RIBEIRO, O.S.; PEREIRA, A.C. (2009) Influence of vasopressor agent in septic shock mortality. Results from the Portuguese Community-Acquired Sepsis Study (SACiUCI study). *Crit Care Med*. 2009 Feb;37(2):410-6.

RAFFETTO, J.D.; KHALIL, R.A. (2008) Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochem Pharmacol*; 75(2):346-59.

RAJAGOPALAN, S.; MENG, X.P.; RAMASAMY, S.; HARRISON, D.G.; GALIS, Z.S. (1996) Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. implications for atherosclerotic plaque stability. *J Clin Invest*.; 98(11):2572-9.

QUARTIN, A.A.; SCHEIN, R.M.; KETT, D.H.; PEDUZZI, P.N. (1997) Magnitude and duration of the effect of sepsis on survival. *Jama*; 277: 1058.

QUENZER, R.; et al. (1994) Infections in the critically ill. In: BONGARD FS & SUE DY. *Current critical care diagnosis & treatment*. Appleton & Lange, Connecticut, cap. 6, p. 131-155.

QURESHI, S.T.; LARIVIERE, L.; LEVEQUE, G.; CLERMONT, S.; MOORE, K.J.; GROS, P.; MALO, D. (1999) Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J Exp Med*, 189:615-625.

RAPOPORT, R. M.; DRAZNIN, M. B.; MURAD, F. (1983) Endothelium-Dependent Vasodilator-And Nitrovasodilator-Induced Relaxation may be mediated through cyclic GMP formation and cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Trans Assoc Am Physicians*, 96: 19-30.

RAPOPORT, R.M.; MURAD, F. (1983) Agonist-induced endothelium-dependent relaxations in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. *Circ Res*. 52: 352-357.

RAUPACH, B.; KAUFMANN, S.H. (2001) Immune responses to intracellular bacteria. *Curr Opin Immunol*;13:417-28.

REMICK, D.G.; NEWCOMB, D.E.; BOLGOS, G.L.; CALL, D.R. (2000) Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. *Shock* 13, 110–116.

RITTIRSCH, D.; HOESEL, L.M.; WARD, P.A. (2007) The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *J. Leukoc. Biol.* 81, 137–143.

RITTIRSCH, D.; HUBER-LANG, M.S.; FLIERL, M.A.; WARD, P.A. (2009) Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *NATURE PROTOCOLS*. Vol.4 No.1, 31-36.

ROOS, J., DIGREGORIO, P. J., YEROMIN, A. V., OHLSEN, K., LIOUDYNO, M., ZHANG, S., SAFRINA, O., KOZAK, J. A., WAGNER, S. L., CAHALAN, M. D., VELICELEBI, G. e STAUDERMAN, K. A. (2005) "STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca^{2+} channel function." *J Cell Biol.* 169(3): 435-445.

RUBANYI, G.M. (1988) Vascular effects of oxygen-derived free radicals. *Free Radic Biol Med*; (4)2:107-120.

RUSSELL, J. A. (2008). The current management of septic shock. *Minerva Med*, v. 99, n. 5, p. 431-458, Oct.

SALES JR, J.A.L.; DAVID, C.M.; HATUM, R. et al. (2006) Sepsis Brasil: Estudo epidemiológico da sepsis em unidades de terapia intensiva brasileiras. *Rev Bras Ter Intensiva*;18:9-17.

SALVEMINI, D.; CUZZOCREA, S. (2002) Oxidative stress in septic shock and disseminated. Intravascular coagulation. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 1173-1185.

SANDS, K.E.; BATES, D.W.; LANKEN, P.N.; GRAMAN, P.S.; HIBBERD, P.L.; KAHN, K.L.; PARSONNET, J.; PANZER, R.; ORAV, E.J.; SNYDMAN, D.R. (1997) Epidemiology of sepsis syndrome in 8 academic medical centers. Academic Medical Center Consortium Sepsis Project Working Group. *JAMA* 278:234–240.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. (1968) Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry*, 25, pp. 192–205.

SILVA, E.; PEDRO, M.A.; SOGAYAR, A.C.; MOHOVIC, T.; et al. (2004) Brazilian Sepsis Epidemiological Study. (BASES study). *Crit. Care.* 8: R251-260.

SILVA, B.L.; RIBEIRO, F.F.; ANDRADE, S.S.C.; FONSÊCA L.C.T. (2013) Hospital morbidity and mortality by sepsis in the unique health system. *Rev enferm UFPE on line*, Recife, 7(1):23-9.

SINGER, M.; DE SANTIS, V.; VITALE, D.; JEFFCOATE, W. (2004) Multiorgan failure is an adaptive, endocrinemediated, metabolic response to overwhelming systemic inflammation. *Lancet*; 364:545–548.

SOMLYO, A.P.; SOMLYO, A.V. (1994) Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature*. Nov 17;372(6503):231-6.

SOMLYO, A.P.; SOMLYO, A.V. (2003) Ca^{2+} sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases and myosin phosphatase. *Physiol Rev* 83:1325–1358.

STONE, J. R.; MARLETTA, M. A. (1995). Heme stoichiometry of heterodimeric soluble guanylate cyclase. *Biochemistry*, 34(45): 14668-14674.

SWEENEY, H. L.; YANG, Z.; ZHI, G.; STULL, J. T.; TRYBUS, K. M. (1994) Charge replacement near the phosphorylatable serine of the myosin regulatory light chain mimics aspects of phosphorylation. *Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 1490-1494.

SUZUKI, Y.; ORTEGA, M.R.; LORENZO, O.; RUPEREZ, M.; ESTEBAN, V.; EGIDO, J. (2003) Inflammation and angiotensin II. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 35: 881-900.

TADA, M., KIRCHBERGER, M. A. e KATZ, A. M. (1975) "Phosphorylation of a 22,000-dalton component of the cardiac sarcoplasmic reticulum by adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase." *J Biol Chem* 250(7): 2640-2647.

TANIYAMA, Y.; GRIENDLING, K.K. (2003) Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension* 42, 1075-1081.

THIEMERMANN, C.; VANE, J. (1990) Inhibition of nitric oxide synthesis reduces the hypotension induced by bacterial lipopolysaccharides in the rat in vivo. *Eur J Pharmacol*; 182:591-5.

TOUYZ, R.M.; SCHIFFRIN, E.L. (2004) Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem Cell Biol*;122:339-59.

TREACHER, D.F.; BROWN, K.A. (2009). The basic science of sepsis. *Surgery*. 27:11, 465-469.

TSAI, M.H.; JIANG, M.J. (2010) Reactive oxygen species are involved in regulating $\alpha 1$ -adrenoceptor-activated vascular smooth muscle contraction. *J Biomed Sci*; 17: 67.

TSIOTOU, A.G.; SAKORAFAS, G.H.; ANAGNOSTOPOULOS, G.; BRAMIS, J. (2005) Septic shock; current pathogenetic concepts from a clinical perspective. *Med Sci Monit*. Mar;11(3):RA76-85.

VAN BREEMEN, C.; CAUVIN, C.; YAMAMOTO, H.; ZSCHAUER, A. (1987) Vascular muscle calcium channels. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 10: S10-S15.

VARON, J.; MARIK, P.E. (1999) Multiple Organ Dysfunction Síndrome. In: Irwin RS, Cerra FB, Rippe JM - *Intensive Care Medicine*. Lippincott-Raven Philadelphia;2044-2048.

VIAPPIANI, S.; NICOLESCU, A.C.; HOLT, A.; SAWICKI, G.; CRAWFORD, B.D.; LEÓN, H.; VAN MULLIGEN, T.; SCHULZ, R. (2009) Activation and modulation of 72kDa matrix metalloproteinase-2 by peroxynitrite and glutathione. *Biochem Pharmacol* 77(5): 826-34.

VINCENT, J.L.; FERREIRA, F.L. (2002) Multiple Organ Failure: Clinical Syndrome, In: Evans TW, Fink MP - Mechanisms of Organ Dysfunction in Critical Illness. Update in Intensive Care Medicine Springer – Verlag Berlin Heidelberg;394-403.

VINCENT, J.L.; MORENO, R.; TAKALA, J.; WILLATTS, S.; DE MENDONÇA, A.; BRUINING, H.; et al. (1996) The SOFA (sepsis related organ failure assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the working group on sepsis-related problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intens Care Med*;22:707-10.

VINCENT, J.L.; SAKR, Y.; SPRUNG, C.L. RANIERI, V.M.; REINHART, K.; GERLACH, H.; MORENO, R.; CARLET, J.; LE GALL, J.R.; PAYEN, D. (2006) Sepsis in European intensive care units: Results of the SOAP study. *Crit Care Med*;34:344-353.

VINCENT, J.L.; WENDON, J.; GROENEVELD, J.; MARSHALL, J.C.; STREAT, S.; CARLET, J. (2003) The PIRO Concept: O is for organ dysfunction. *Crit Care* 7:260–264.

VIRDIS, A.; GHIADONI, L.; TADDEI, S. (2010) Human endothelial dysfunction: EDCFs. *Pflugers Arch - Eur J Physiol*.

WAN, L.; BELLOMO, R.; GIANTOMASSO, D.; RONCO, C. (2003) The pathogenesis of septic acute renal failure. *Curr Opin Crit Care*;9(6):496-502.

WANG, T.; DERHOVANESSIAN, A.; DE CRUZ, S.; BELPERIO, J.A.; DENG, J.C.; HOO, G.S. (2014) Subsequent infections in survivors of sepsis: epidemiology and outcomes. *J Intensive Care Med*. Mar-Apr;29(2):87-95.

WATTS, J.A., KLINE, J.A. (2003). Bench to bedside: the role of mitochondrial medicine in the pathogenesis and treatment of cellular injury. *Acad Emerg Med*;10:985–97.

WEILER, H., RUF, W. (2008). Activated protein C in sepsis: the promise of non-anticoagulant activated protein C. *Curr Opin Hematol*; 15: 487-93.

WESTPHAL, G.A.; VIEIRA, C.D.; ORZECOWSKI, R.; KAEFER, K.M; ZACLIKEVIS, V.R.; MASTROENI, M.F. (2012) Análise da qualidade de vida após a alta hospitalar em sobreviventes de sepse grave e choque séptico. *Rev Panam Salud Publica* 31(6).

WETTSCHURECK, N.; OFFERMANN, S. (2002) Rho/Rho-Kinase mediated signaling in physiology and pathophysiology. *J Mol Med*; 80:629-638.

WINTERS, B.D.; EBERLEIN, M.; LEUNG, J.; NEEDHAM, D.M.; PRONOVOST, P.J.; SEVRANSKY, J.E. (2010) Long-term mortality and quality of life in sepsis: a systematic review. *Crit Care Med.* May;38(5):1276-83.

YAN, S.D.; BIERHAUS, A.; NAWROTH, P.P.; STERN, D.M. (2009) RAGE and Alzheimer's disease: a progression factor for amyloid-beta-induced cellular perturbation? *J. Alzheimers Dis.* 16:833–43.

YAN, S.D.; ZHU, H.; FU, J.; et al. (1997) Amyloid-beta peptide-receptor for advanced glycation endproduct interaction elicits neuronal expression of macrophage colony stimulating factor: a proinflammatory pathway in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94:5296–301.

YENDE, S.; D'ANGELO, G.; KELLUM, J.A.; WEISSFELD, L.; FINE, J.; WELCH, R.D.; KONG, L.; CARTER, M.; ANGUS, D.C. (2008) Inflammatory markers at hospital discharge predict subsequent mortality after pneumonia and sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* Jun 1;177(11):1242-7.

YENDE, S.; LINDE-ZWIRBLE, W.; MAYR, F.; WEISSFELD, L.A.; REIS, S.; ANGUS, D.C. (2014) Risk of cardiovascular events in survivors of severe sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* May 1;189(9):1065-74.

ZHANG, K.; MAO, X.; FANG, Q.; JIN, Y.; CHENG, B.; XIE, G.; LI, H.; YU, L.; ZHU, T.; WANG, H.; LIU, X.; ZHANG, Y.; JIN, Y.; ZHANG, N.; LOU, T.; FANG, X.M. (2013) Impaired long-term quality of life in survivors of severe sepsis: Chinese multicenter study over 6 years. *Anaesthesist.* 2013 Dec;62(12):995-1002.

ZHOU, M.; WANG, P.; CHAUNDRY, I.H. (1998) Cardiac contractility and structure are not significantly compromised even during the late, hypodynamic stage of sepsis. *Shock*;5:352-58.

ZIMMERMANN, J.J., (1995). Defining the role of oxyradicals in the pathogenesis of sepsis. *Crit. Care Med.* 23, 616–617.

ZUCCHI, R.; RONCA-TESTONI, S. (1997) The sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} channel/ryanodine receptor: modulation by endogenous effectors, drugs, and disease states. *Pharmacol Rev* ;49:1-51.